



**Scuola di Dottorato in Scienze Biologiche e Mediche**

**Corso di Dottorato in Neurobiologia XXVII CICLO**

**Coordinatore: Prof.ssa DANIELA PAROLARO**

**STUDIO DELLE MODIFICAZIONI ISTONICHE E DELLE  
ALTERAZIONI TRASCRIZIONALI INDOTTE DAL  
TRATTAMENTO CRONICO CON THC IN  
ADOLESCENZA.**

**Tutor: Prof.ssa TIZIANA RUBINO**

Tesi di dottorato di:

**PAMELA PRINI**

Matricola Nr. 617371

ANNO ACCADEMICO 2013/2014

# *INDICE*

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>6</b>
1. CANNABIS E SISTEMA ENDOCANNABINOIDE	7
RECETTORI PER I CANNABINOIDI E LORO LOCALIZZAZIONE	10
LIGANDI PER I RECETTORI CANNABINOIDI	14
MECCANISMO D'AZIONE DEGLI ENDOCANNABINOIDI	
2. CANNABIS E ADOLESCENZA	15
3. EPIGENETICA	26
4. MECCANISMI EPIGENETICI:	
METILAZIONE DEL DNA	27
MODIFICAZIONI ISTONICHE	28
ACETILAZIONI ISTONICHE	28
METILAZIONE ISTONICA	29
ALTRE MODIFICAZIONI ISTONICHE	29
5. MODIFICAZIONI EPIGENETICHE NEI PRINCIPALI DISTURBI PSICHIATRICI	
DEPRESSIONE	30
SCHIZOFRENIA	31
TOSSICODIPENDENZA	32
<b>SCOPO</b>	<b>34</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>37</b>
ANIMALI	37
FARMACI E TRATTAMENTI	37
SAGGI BIOCHIMICI E MOLECOLARI:	
PRELIEVO DEL TESSUTO E RACCOLTA DELLE AREE CEREBRALI	39
PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI PROTEICI ED ISTONICI	39
DOSAGGIO PROTEICO	40
SDS PAGE	41

WESTERN BLOTTING	42
SVILUPPO CON METODO ECL	43
STRIP	44
ANALISI STATISTICA	44
ESTRAZIONE DELL'RNA E QUANTIFICAZIONE	44
PURIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'RN45A MESSAGGERO	45
RETROTRASCRIZIONE	46
REAL-TIME PCR	47
ANALISI STATISTICA	50
TEST COMPORTAMENTALI:	
TEST DEL RICONOSCIMENTO DEL NUOVO OGGETTO	50
TEST DEL NUOTO FORZATO	51
TEST D'INTERAZIONE SOCIALE	52
ANALISI STATISTICA	53
<b>RISULTATI E FIGURE</b>	<b>54</b>
VALUTAZIONE DELLE MODIFICAZIONI ISTONICHE	54
STUDIO DEL PROFILO GENICO	57
ANALISI DEI LIVELLI PROTEICI DI SUV39HI	65
CO-TRATTAMENTO CON CHAETOCIN E ANALISI COMPORTAMENTALE	67
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>70</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>84</b>

*RIASSUNTO*

## RIASSUNTO

Il consumo di Cannabis fra gli adolescenti è sempre più diffuso ed il dibattito politico a favore della sua legalizzazione ribadisce la necessità di comprendere la relazione tra esposizione precoce alla Cannabis e successivo sviluppo di patologie psichiatriche.

Studi condotti precedentemente nel nostro laboratorio hanno dimostrato che ratti femmine trattati cronicamente durante il periodo adolescenziale (35-45 post natal day o PND) con dosi crescenti dell'ingrediente psicoattivo della cannabis, il delta-9-tetraidrocannabinolo (THC), sviluppano in età adulta un fenotipo simil depressivo-psicotico. Questo fenotipo non si sviluppa quando lo stesso trattamento viene condotto in età adulta, suggerendo quindi che l'adolescenza rappresenta un periodo particolarmente vulnerabile agli effetti avversi della cannabis. Tuttavia la neurobiologia di questa vulnerabilità rimane ancora poco chiara.

Effetti come quelli indotti dal THC, che si sviluppano nel tempo e permangono anche a lungo, spesso richiedono cambiamenti dell'espressione genica ed è noto che un ruolo determinante nel modificare l'espressione genica è rivestito dai meccanismi epigenetici. Inoltre, un numero sempre maggiore di lavori dimostra il coinvolgimento dei meccanismi epigenetici nell'eziologia delle patologie psichiatriche.

Sulla base di queste premesse, il primo obiettivo della presente tesi è stato quello di valutare se il trattamento cronico con THC in adolescenza fosse in grado di indurre alterazioni delle modificazioni istoniche. A tale scopo ratti femmine adolescenti (PND 35) del ceppo Sprague-Dawley sono stati trattati due volte al giorno, per 11 giorni, con iniezioni intraperitoneali (ip) di dosi crescenti di  $\Delta^9$ -THC: 2.5 mg/kg (35-37 PND), 5 mg/kg (38-41 PND), 10 mg/kg (42-45 PND), o del rispettivo veicolo. Due, 24 e 48 ore dalla fine del trattamento, tramite saggi di Western blot, sono state valutate alcune delle modificazioni epigenetiche più coinvolte nello sviluppo delle malattie psichiatriche. In particolare sono state investigate le modificazioni dell'istone H3, tra cui le metilazioni della lisina 9 e 27 (marker di repressione genica) e le acetilazioni della lisina 9 e 14 (marker di

attivazione genica). I saggi sono stati condotti a livello della corteccia prefrontale, un'area particolarmente importante per la modulazione del comportamento emotivo.

I risultati ottenuti dimostrano che il trattamento cronico con THC in adolescenza è in grado di alterare il normale rimodellamento della cromatina, inducendo cambiamenti nelle modificazioni istoniche che avvengono a livello della corteccia prefrontale. Queste alterazioni sono già visibili subito dopo 2 ore dalla sospensione del trattamento con un incremento dei livelli di H3K9me3 (25%). Tale incremento diventa più intenso (48%) a 24 ore dall'ultima somministrazione di THC ed è accompagnato da un incremento significativo dei livelli di H3K9me2 (25%). Oltre alle alterazioni dei marker associati a repressione genica, a 24 ore dall'ultima iniezione di THC si evidenziano anche alterazioni dei livelli di H3K14Ac (26%), un marker associato ad attivazione trascrizionale. Queste alterazioni risultano essere transienti in quanto non sono più presenti 48 ore dopo la sospensione del trattamento.

A scopo comparativo, lo stesso schema di trattamento e le stesse analisi sono state condotte in animali adulti (75-85 PND). I risultati ottenuti hanno mostrato che, a 2 ore dalla fine del trattamento, si osserva un incremento significativo dell'H3K9me3, come quello osservato in seguito all'esposizione adolescenziale, ma al contrario di quanto osservato negli animali adolescenti, in tutte le tempistiche successive (2 e 24 ore) non vi è nessuna alterazione significativa. Complessivamente, i risultati ottenuti supportano l'ipotesi che la H3K9me3 sia una delle principali modificazioni istoniche compromesse dall'esposizione cronica al THC e che questo effetto sia indipendente dal periodo di esposizione, mentre l'incremento di H3K9me2 e di H3K14ac siano specificatamente dovute all'esposizione adolescenziale.

Dato che le modificazioni epigenetiche si riflettono sulla trascrizione genica, il secondo scopo della seguente è stato quello di valutare se il trattamento cronico con THC induce alterazioni trascrizionali a livello della PFC degli animali adolescenti. L'evento biologico che caratterizza il cervello adolescente è l'intenso rimodellamento sinaptico ed il sistema endocannabinoide sembra giocare un ruolo importante nel controllo dei meccanismi di plasticità sinaptica.

Sulla base di queste evidenze, sono stati condotti saggi di Real-Time PCR per valutare il profilo di espressione di geni del sistema endocannabinoide e di geni direttamente o indirettamente coinvolti nei processi di plasticità sinaptica. Più specificatamente sono stati valutati geni del sistema endocannabinoide (Cnr1, Faah, Mgl1, Ppara e Pparg), geni appartenenti al sistema glutammatergico (Gria1, Gria2, Grin1, Grin2a, Grin2b, Grm1, Grm2, Grm3 e Grm5), GABAergico (Gabbr1, gabbr2, Gabra1, gabra2, Gabrb1, Gad1 e Abat) e serotoninergico (Htr2a), di geni codificanti per enzimi coinvolti nelle modificazioni epigenetiche (Sirt1) e codificanti per proteine direttamente coinvolte nei processi e nelle pathway di rimodellamento sinaptico (Dlg4, Bdnf, Ntrk12, Camk2a, Camk2g, Pdyn, Prkaca, Nos1, Creb1, Homer1, Pick1, Synpo, Crebbp, Arc, Reln e Adcy1). Per studiare il time-course delle possibili alterazioni trascrizionali e la loro persistenza, i saggi sono stati condotti a 2, 24 e 48 ore dall'interruzione del trattamento e al PND 75.

I risultati ottenuti dall'analisi dei trascritti mostrano un quadro di generale downregolazione indotto dal trattamento adolescenziale con THC. Questo effetto si manifesta già a due ore dalla fine del trattamento e diventa più intenso e ampio a 24 ore, dove 17 trascritti su 37 sono significativamente ridotti. Questo forte e generale effetto di downregolazione osservato fino a 24 ore dalla fine del trattamento, a fronte delle alterazioni osservate a livello istonico, potrebbe essere giustificato dall'incremento di di- e tri-metilazione della lisina 9 dell'istone H3, osservato nelle stesse tempistiche. Al contrario, a 48 ore dall'ultima iniezione, il quadro appare ben diverso: tutti i messaggeri vengono riportati a controllo o sono significativamente aumentati. A sua volta, questo recupero potrebbe essere mediato a livello istonico dall'incremento di acetilazione. È quindi ipotizzabile che in seguito al grosso effetto di repressione genica indotto dal trattamento cronico con THC, il cervello adolescente risponda innescando un meccanismo atto a cotrobilanciare la downregolazione osservata.

Per valutare se negli animali pre-esposti al THC durante il periodo adolescenziale le alterazioni a carico dei livelli di messaggero fossero alterazioni persistenti o transienti, lo stesso pannello di analisi è stato condotto a 30 (PND 75) giorni dall'ultima iniezione di THC, quando il fenotipo simil depressivo-psicotico è presente. I risultati ottenuti al PND 75 indicano che 8 geni risultano essere



significativamente alterati. Tra questi vi sono i messaggeri di *Gria1*, *Gria2*, *Grm3*, *Gabra1*, *Abat*, *Dlg4* e *Ntrk12* che sono significativamente incrementati, mentre solo il messaggero del gene *Reln*, che codifica per la Relina, risulta essere fortemente downregolato. È probabile che la maggior parte degli eventi innescati dal trattamento cronico con THC in adolescenza vengano recuperati al raggiungimento dell'età adulta, fuorchè i livelli trascrizionali di alcuni geni, tra cui *Gria1* e *Reln*, che sono particolarmente interessanti per il fenotipo mostrato da questi animali, in quanto sembrano giocare un ruolo importante nei disturbi psichiatrici.

Sempre a scopo comparativo, lo studio del profilo genico è stato condotto negli animali adulti. Il profondo effetto di downregolazione osservato a 24 ore dall'ultima iniezione di THC negli animali adolescenti, non è stato riscontrato quando lo stesso trattamento è stato condotto in età adulta. Infatti, osservando i dati ottenuti dall'analisi degli stessi geni negli animali trattati durante l'età adulta, solo i messaggeri di 5 geni risultano essere significativamente ridotti: *Ppara*, *Grm2*, *Pick1* e *Reln*, mentre solo il gene che codifica per *Bdnf* risulta essere significativamente incrementato rispetto agli animali controllo. Per quanto riguarda il trattamento in età adulta, è quindi evidente che il THC non sia in grado di indurre modificazioni dei trascritti così profonde come quelle osservate in seguito al trattamento in adolescenza.

Dato che il principale evento epigenetico indotto dall'esposizione cronica al THC è l'incremento dei livelli di H3K9me3, l'obiettivo successivo è stato quello di valutare l'espressione dell'enzima responsabile della trimetilazione dell'H3K9 *Suv39h1*, in seguito al trattamento adolescenziale con THC.

I risultati ottenuti ci hanno mostrato che 2 e 24 ore dopo l'ultima iniezione di THC, i livelli di *Suv39h1* sono significativamente aumentati nella corteccia prefrontale, suggerendo che l'incremento di trimetilazione dell'H3K9, osservato 2 e 24 ore dopo il trattamento adolescenziale con THC, sia la diretta conseguenza dell'incremento di *Suv39h1*.

Infine, l'ultimo obiettivo di questa tesi è stato quello di comprendere il ruolo svolto dall'incremento di H3K9me3 nello sviluppo del fenotipo simil depressivo-psicotico indotto dall'esposizione adolescenziale al THC. A tale scopo gli animali

adolescenti esposti al THC sono stati co-trattati con il farmaco epigenetico Chaetocin, un inibitore dell'enzima Suv39h1. I test comportamentali condotti al PND 75, time-point in cui gli animali raggiungono l'età adulta e si sviluppa il fenotipo simil depressivo-psicotico, dimostrano che il co-trattamento con Chaetocin è in grado di prevenire i deficit cognitivi indotti dall'esposizione adolescenziale al THC, ma non quelli della sfera emotiva.

In conclusione, i risultati presentati in questo progetto di tesi indicano che l'esposizione adolescenziale alla cannabis agisce a livello epigenetico inducendo alterazioni delle modificazioni istoniche. Tali modifiche si ripercuotono a livello trascrizionale causando alterazioni a breve e a lungo termine di specifici geni coinvolti nei processi di plasticità sinaptica. Gli effetti osservati sia a livello istonico che trascrizionale sembrano essere età-dipendenti, indicando una maggiore vulnerabilità del cervello adolescente agli effetti avversi della cannabis. I nostri risultati supportano inoltre il coinvolgimento, almeno in parte, della trimetilazione della lisina 9 sull'istone H3 nello sviluppo delle alterazioni comportamentali osservate negli animali adulti pre-esposti al THC. Infatti, la somministrazione durante l'esposizione adolescenziale al THC di un inibitore dell'enzima Suv39h1, l'enzima responsabile di questa modificazione, previene la comparsa dei deficit cognitivi osservati in età adulta.

Studi futuri saranno necessari per ricercare quali meccanismi epigenetici possano essere coinvolti nello sviluppo dei deficit della sfera emotiva indotti dall'esposizione adolescenziale al THC

# *INTRODUZIONE*

## INTRODUZIONE

### 1. CANNABIS E SISTEMA ENDOCANNABINOIDE

La Cannabis Sativa o Canapa Indiana, nota anche con il nome di Marijuana, è una delle più antiche piante conosciute dall'umanità. Appartenente alla famiglia delle Cannabaceae, essa rappresenta l'unica pianta al mondo che può essere utilizzata sia come droga che come fibra.

La cannabis contiene più di 600 sostanze: di queste circa un centinaio risultano essere di particolare interesse in quanto facenti parte della classe dei cannabinoidi, la cui caratteristica peculiare è la struttura terpenfenolica; i più abbondanti rappresentanti di tale classe sono il cannabinolo, il cannabidiolo ed alcuni isomeri del tetraidrocannabinolo. Tuttavia, il composto responsabile della maggior parte degli effetti psicoattivi della cannabis è il delta-9-tetraidrocannabinolo (THC) isolato nel 1964 da Gaoni e Mechoulam (Gaoni e Mechoulam, 1964). Il THC si trova principalmente in una resina dorata appiccicosa essudata dalle inflorescenze e contenuta anche nelle foglie della pianta. La percentuale di THC può variare dal 7 al 14%, anche se negli ultimi anni sono comparse delle varietà con una percentuale di THC che può raggiungere anche il 30% (fino a quattro volte in più dei livelli normali), grazie alle tecniche di coltivazione indoor che permettono di ottimizzare la qualità del prodotto. La maggioranza degli altri cannabinoidi non dà effetti psichici significativi, anche se possono interagire con il THC variandone gli effetti sia in senso positivo che negativo. E' utile sottolineare che altri composti si ottengono per pirolisi dal fumo di cannabis e possono a loro volta partecipare agli effetti psicoattivi della droga (Tjeerdema, 1987).

Il principale effetto della cannabis è quello di indurre uno stato detto "high" in cui la persona appare rilassata e mediamente euforica, con alterazioni percettive che possono includere distorsioni temporali, uditive e visive ed un rallentamento delle funzioni cognitive; tra i sintomi più comunemente associati all'utilizzo di cannabis si riscontrano inoltre alterazioni significative correlate con l'incremento del battito cardiaco, vasodilatazione, bocca secca e stimolazione dell'appetito.

Solo negli anni '90 si arriva all'identificazione e al clonaggio dei recettori per i cannabinoidi (Matsuda L. et al., 1990; Munro et al., 1993), a cui segue la scoperta di composti cannabici endogeni (Devane et al., 1992) e la sintesi di composti agonisti ed antagonisti selettivi (Rinaldi-Carmona M., 1992).

Oggi, con il termine "sistema degli endocannabinoidi" ci si riferisce ai recettori, ai loro ligandi endogeni ed ai meccanismi che ne regolano la sintesi, il trasporto e la degradazione (Di Marzo et al., 2004; Freund et al., 2003; Fride, 2005; Piomelli, 2003).

## RECETTORI PER I CANNABINOIDI E LORO LOCALIZZAZIONE

A causa dell'alta lipofilia dei cannabinoidi naturali, per molto tempo si ebbe la convinzione che il loro meccanismo d'azione risiedesse nella capacità di stabilire interazioni aspecifiche con i lipidi di membrana, alterandone così la fluidità.

L'osservazione che i cannabinoidi possedessero una certa stereoselettività, come evidenziato dalla forte perdita di potenza degli enantiomeri del  $\Delta^9$ -THC utilizzati in svariati test comportamentali, rendeva tuttavia plausibile l'ipotesi di un'interazione specifica e la presenza quindi di specifici recettori di membrana deputati alla trasduzione del segnale.

Negli anni '90 sono stati identificati e clonati due recettori cannabici: il recettore CB1, distribuito prevalentemente nel sistema nervoso centrale (Herkenham et al., 1991) e il recettore CB2, localizzato prevalentemente a livello periferico (Munro et al., 1993). Studi recenti dimostrano la presenza del recettore CB2 nella glia durante i processi infiammatori e neurodegenerativi, mentre le evidenze di una sua espressione neuronale sono ancora contraddittorie.

Inoltre, recenti lavori hanno dimostrato come gli endocannabinoidi siano in grado di legarsi a recettori diversi dai CB1 e CB2, tra cui i recettori GPR55, PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  e i TRPV1.

## RECETTORE CB1

Il primo recettore cannabico ad essere identificato fu il recettore CB1 (Matsuda L. et al., 1990). I recettori CB1 sono presenti in numerosi mammiferi, incluso l'uomo, e sono particolarmente abbondanti in alcune regioni cerebrali: si tratta, per esempio, dei gangli della base (substantia nigra, globo pallido, nucleo entopeduncolare e caudato-putamen laterale), dello strato molecolare del

cervelletto, dell'ippocampo (il particolare le zone CA1 e giro dentato) e della corteccia cerebrale (Herkenham et al., 1991). Sebbene in minor densità, i recettori CB1 sono rilevabili anche in aree limbiche quali l'accumbens e l'amigdala, nell'ipotalamo, nel mesencefalo, nel midollo allungato e nel midollo spinale.

Esiste una forte e peculiare correlazione tra la distribuzione del recettore cannabico e gli effetti della sua attivazione in vivo: l'elevata densità del recettore nei gangli basali e nel cervelletto, cioè a livello dei sistemi motori, è infatti riconducibile alle alterazioni dell'attività motoria indotta dai cannabinoidi (Herkenham et al., 1991); i recettori cannabici corticali sono senz'altro coinvolti in alcuni degli effetti psicoattivi dei cannabinoidi, quali l'euforia iniziale, l'alterato senso del tempo, la difficoltà a concentrarsi, allucinazioni e disforia; l'alta densità del recettore nell'ippocampo potrebbe, invece, essere alla base delle alterazioni della memoria e dell'apprendimento indotte dai cannabinoidi (Miller e Braconnier, 1983). L'assenza di recettori CB1 nel tronco cerebrale, dove sono localizzati i centri regolatori della funzione respiratoria e cardiaca (Millhorn e Eldridge, 1986), ben si accorda con la bassa letalità legata all'overdose di cannabis. Sebbene i recettori CB1 siano prevalentemente localizzati a livello del sistema nervoso centrale, basse densità recettoriali sono state identificate anche nei tessuti periferici quali la milza, il cuore, i testicoli, il timo, il midollo osseo e le tonsille (Amery, 1998). Sono anche espressi a livelli più bassi nella microglia e l'attivazione di tali recettori influenza la funzione delle cellule gliali, come la migrazione verso i siti danneggiati (Stella, 2010).

I recettori CB1 appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alle G proteine e presentano, quindi, la tipica struttura con i sette domini transmembrana, la porzione N-terminale extracellulare e quella C-terminale intracellulare che comunica con la proteina trimerica composta da una subunità  $\alpha$ , con attività GTP-asi, una subunità  $\beta$  e una subunità  $\gamma$  (Howlett et al., 1991). L'attivazione dei recettori CB1, attraverso l'accoppiamento con proteine Gi e Go, inibisce l'attività dell'adenilato ciclasi, stimola la via delle MAP chinasi (Amery, 1998), modula l'attivazione delle correnti di potassio di tipo A e "inwardly-rectifying", inibisce le correnti di calcio di tipo N e P/Q.

Nel sistema nervoso centrale i CB1R sono localizzati prevalentemente a livello presinaptico e la loro attivazione inibisce il rilascio dei neurotrasmettitori dagli assoni terminali.

## RECETTORE CB2

Il recettore CB2 è stato clonato qualche anno più tardi e possiede un'omologia del 44% con il recettore CB1 (Munro et al., 1993). I recettori CB2 sono anch'essi accoppiati alle proteine Gi, perciò la loro attivazione porta all'inibizione dell'adenilato ciclasi e all'attivazione della via delle MAP chinasi, ma non hanno alcun effetto sui canali ionici. I recettori CB2 sono anche capaci di aumentare il rilascio di ceramide e ossido nitrico (Amery, 1998). Questi recettori sono localizzati principalmente sulle cellule immunitarie e, quando attivati, possono modulare la migrazione delle cellule stesse e il rilascio di citochine (Klein et al., 1998; Schatz et al., 1997). Elevati livelli del recettore CB2 si riscontrano inoltre nella microglia attivata (Stella, 2010; Pertwee et al. 2010; Di Marzo, 2009).

## ALTRI RECETTORI PER I CANNABINOIDI

### Recettore GPR55

Recenti lavori dimostrano che gli endocannabinoidi sono in grado di legare il recettore "orfano" chiamato GPR55, il quale viene prudentemente definito come recettore "atipico" per i cannabinoidi. Anche il GPR55 appartiene alla classe dei recettori accoppiati alle G proteine, è presente in numerosi organi e tessuti, incluso il cervello ed ha un'omologia di sequenza col CB1 inferiore al 20%. A differenza dei CB1R e CB2R, trasduce il segnale attraverso proteine Gq e G12/13, attivando la fosfolipasi C e la famiglia delle piccole GTPasi, come ad esempio RhoA. Gli antagonisti classici dei recettori CB1 e CB2 si comportano come agonisti nei confronti del GPR55, mentre l'agonista cannabico sintetico CP-55,940 agisce come antagonista/agonista parziale.

### Recettore TRPV1

È ormai noto che il cannabinoide endogeno AEA, ma non il 2-AG, sia in grado di attivare i recettori per i vanilloidi TRPV1 (transient receptor potential vanilloid type 1) legandosi, anche se con affinità minore rispetto a quella per i recettori CB1 e CB2, a livello di un sito citosolico e provocando un aumento di  $Ca^{2+}$  intracellulare (Di Marzo et al., 2001; Zygmunt et al., 1999); tuttavia il ruolo di questi recettori canale sugli effetti comportamentali e neurochimici dell'anandamide rimane ancora largamente da chiarire (Piomelli, 2003; Solinas et al., 2006; Solinas et al., 2007b).

Il recettore TRPV1 è un canale non selettivo per cationi, di natura eccitatoria, altamente espresso nei neuroni primari delle fibre afferenti dove agisce come integratore molecolare degli stimoli nocicettivi. Viene anche espresso in diverse aree cerebrali e talvolta è colocalizzato con il CB1R. TRPV1 può essere attivato da diversi stimoli, quali il calore, protoni e agonisti vanilloidi, così definiti per la presenza nella loro struttura di un nucleo vanillinico, come nel principio attivo del peperoncino, la capsaicina.

#### Recettori PPAR

Dati recenti dimostrano che alcuni endocannabinoidi o i loro metaboliti sono in grado di attivare i recettori nucleari "proliferator-activated" dei perossisomi (PPAR) ed in particolare i PPAR alfa e i PPAR gamma. Attraverso l'interazione con questi recettori nucleari gli endocannabinoidi sembrano regolare il metabolismo glucidico e lipidico, nonché le risposte infiammatorie.

### LIGANDI PER I RECETTORI CANNABINOIDI

#### ENDOCANNABINOIDI

La scoperta dei recettori per i cannabinoidi e la disponibilità di agonisti cannabici altamente selettivi e potenti, ha permesso anche la rapida identificazione di una famiglia di mediatori lipidici che fungono da ligandi naturali per i recettori cannabici: nel 1992 Devane (Devane et al., 1992) isolò infatti da estratti di cervello porcino una sostanza lipidica, l'*N*-arachidonoiletanolamina, chiamata anandamide (dal sanscrito "ananda" che significa serenità interiore, estasi), in grado di legare i recettori cannabici CB1 e CB2 e di indurre gli effetti farmacologici del THC. L'anandamide (AEA), essendo stato il primo agonista endogeno dei recettori cannabinoidi ad essere identificato, viene considerato il capostipite degli endocannabinoidi: questa molecola è in grado di legare sia il recettore CB1 che il recettore CB2, anche se quest'ultimo con un'affinità più bassa (Felder et al., 1996), comportandosi come agonista parziale (Burkey et al., 1997). L'AEA inoltre si comporta come agonista puro per i recettori vanilloidi TPVR1, ma anche in questo caso con un'affinità più bassa di quella per il recettore CB1. È presente ad elevate concentrazioni nell'ippocampo (Felder et al., 1996; Bisogno et al., 1999), nella corteccia, nel talamo (Felder et al., 1996) e nel cervelletto, ma anche nel sistema limbico, nello



striato, nel diencefalo e nel mesencefalo (Bisogno et al., 1999) di specie animali diverse, incluso l'uomo (Felder et al., 1996).

In seguito alla scoperta di questo ligando, sono stati caratterizzati altri derivati degli acidi grassi polinsaturi, che si comportano come agonisti funzionali dei recettori dei cannabinoidi (Sugiura et al., 1995; Hanus et al., 1993). Tra questi composti, nel tentativo di cercare un ligando selettivo per il CB2, è stato identificato nel 1995 il 2-arachidonoilglicerolo (Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995). Sebbene inizialmente isolato da tessuti periferici, il 2-AG è soprattutto presente a livello del sistema nervoso centrale, dove si trova in concentrazioni molto più elevate di quelle dell'AEA. Il 2-AG lega sia i recettori CB1 che i CB2 con minor affinità dell'AEA, ma maggior efficacia mentre non è in grado di attivare i recettori TRPV1.

L'anandamide e il 2-AG hanno strutture diverse, differenti vie di biosintesi e di degradazione ed in aggiunta, sembrano essere prodotti in risposta a differenti stimoli (Di Marzo et al., 2004; Freund et al., 2003; Fried, 2005; Piomelli, 2003). Un recente lavoro ha mostrato come l'anandamide sia in grado di inibire la sintesi e gli effetti del 2-AG a livello dello striato (Maccarrone et al., 2008). Sulla base di questi studi è stato ipotizzato che l'anandamide ed il 2-AG giochino ruoli opposti sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Piomelli, 2003).

Le vie anaboliche e cataboliche per la produzione e la degradazione degli endocannabinoidi, coinvolgono una lunga e complessa cascata enzimatica.

#### SINTESI E DEGRADAZIONE DELL'ANANDAMIDE

Per quanto riguarda l'AEA esistono almeno quattro vie di sintesi alternative che partono dal precursore fosfolipidico di membrana N-arachidonoil-fosfatidiletanolamina (NArPE); la più diretta (conversione diretta) viene catalizzata da una fosfodiesterasi selettiva per le N-acil-fosfatidiletanolamine (NAPE-PLD) in seguito ad un rialzo dei livelli di calcio intracellulari e/o all'attivazione di particolari recettori. Altre vie biosintetiche sempre a partire da NArPE possono essere catalizzate dalla fosfolipasi C con produzione di fosfoAEA (convertita ad AEA da una fosfatasi), o come evidenziato più recentemente, da una forma solubile di fosfolipasi A2 con produzione di 2-lisoNArPE convertita in AEA da una lisofosfolipasi D.

Dopo la sua ricaptazione l'AEA viene idrolizzata dall'enzima amide idrolasi degli acidi grassi (FAAH, un enzima legato alle membrane) con formazione di etanolamina ed acido arachidonico. Esistono anche altre vie degradative, la cui rilevanza, però, a livello fisiologico è ancora discutibile. Ad es. in condizioni in cui l'attività della FAAH è soppressa, l'AEA diventa substrato per la cicloossigenasi 2 (COX2) con produzione dei corrispondenti derivati idroperossidi che vengono poi convertiti in prostamidi.

## 2-ARACHIDONOILGLICEROLO (2-AG)

Il 2-AG viene prodotto quasi esclusivamente per idrolisi del diacilglicerolo (DAG) tramite una diacilglicerolo lipasi (DAGL). Alternativamente, la fosfolipasi A1 può generare un lisofosfolipide che può essere idrolizzato a 2-AG da una lisofosfolipasi C. A livello neuronale la biosintesi di 2-AG sembra essere attivata da elevati livelli intracellulari di calcio. Sebbene l'idrolisi del 2-AG possa essere catalizzata anche dalla FAAH, lo stesso enzima che degrada l'AEA, la via catabolica più importante è a carico di una monogliceride lipasi (MAGL), una serina idrolasi citosolica che converte i monogliceridi in acido grasso e glicerolo. Il 2-AG può essere metabolizzato anche da altre lipasi recentemente isolate quali l'alfabeta idrolasi 6 (ABHD6) ed ABHD12.

Come per l'AEA, in condizioni in cui l'attività della MAGL è soppressa, il 2-AG diventa substrato per la COX2 con produzione dei corrispondenti derivati idroperossidi che vengono poi convertiti in gliceril prostaglandine.

Infine la lipofilia degli endocannabinoidi costituisce un ostacolo anche per il loro "trafficking" citosolico verso i siti di idrolisi (ad es. il reticolo endoplasmico per l'AEA). A tale proposito 2 proteine in grado di legare gli acidi grassi, le FAP 5 e 7, sono state recentemente isolate ed identificate come carriers intracellulari dell'AEA almeno in sistemi di overespressione.

## ALTRI ENDOCANNABINOIDI

La scoperta dell'AEA e del 2-AG è stata seguita da quella di altre molecole che fanno parte della famiglia degli endocannabinoidi come la N-arachidonoil-dopamina (NADA), l'N-arachidonoil glycerol-etere (noladin etere) e l'O-arachidonoil-etanolamina, chiamata anche virodamina, la cui caratterizzazione è ancora in corso.

## AGONISTI

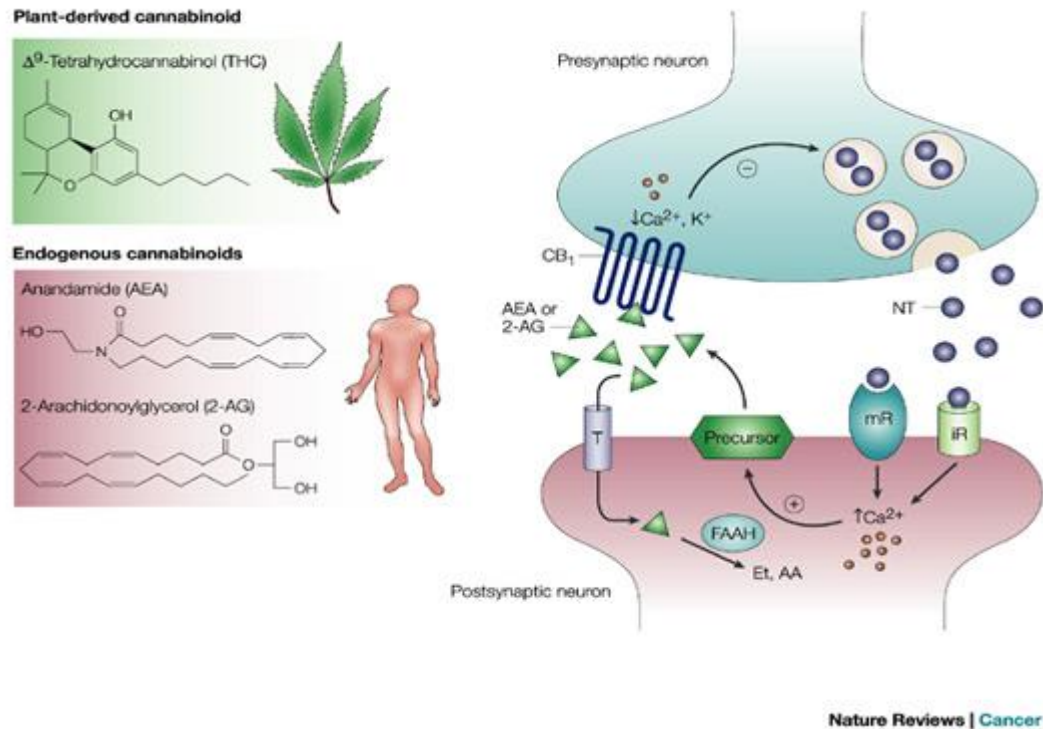
La conoscenza della struttura primaria delle proteine recettoriali ha permesso, nell'ultimi 20 anni, lo sviluppo di numerosi composti agonisti per i due recettori cannabici, a partire da modifiche strutturali nella molecola del THC. In accordo con la loro struttura chimica, gli agonisti cannabici vengono suddivisi in quattro gruppi: il primo gruppo è costituito dai derivati benzopiranic, tra cui ritroviamo i costituenti naturali della cannabis, quali il  $\Delta$ -9THC, il  $\Delta$ -8THC, il cannabinolo ed il costituente non psicoattivo cannabidiolo, nonché alcuni agonisti selettivi per il recettore CB2 quali il JWH133 e l'HU308. Il secondo gruppo comprende i composti biciclici, il cui principale esponente, è il CP-55,940 mentre, al terzo gruppo appartengono gli aminoalchilindoli, rappresentati dal WIN-55212-2 e dal JWH015 selettivo per il recettore CB2; al quarto gruppo appartengono i ligandi endogeni per i recettori cannabici che comprendono amidi ed esteri degli acidi grassi di cui, i rappresentanti più conosciuti e caratterizzati sono l'anandamide ed il 2-arachidonoilglicerolo (Devane et al., 1992; Mechoulam et al., 1995; Sugiura et al., 1995).

## ANTAGONISTI

La ricerca nel campo dei cannabinoidi è progredita ulteriormente grazie alla sintesi di composti antagonisti selettivi per i due tipi di recettori cannabici CB1 e CB2. Il primo composto disponibile è stato l'SR141716A (rimonabant) (Rinaldi-Carmona et al, 1992), antagonista ad alta affinità (dell'ordine delle nanomoli) per il recettore centrale CB1. Esso è attivo anche per via orale e questo, lo rende interessante per un suo possibile impiego terapeutico. Nei test comportamentali l'SR141716A antagonizza pienamente i classici effetti indotti dai cannabinoidi, ma alcuni studi riportano una sua capacità di indurre effetti opposti a quelli degli agonisti cannabici, suggerendo un comportamento da agonista inverso (Bouaboula et al, 1995). L'SR144528 è invece un antagonista selettivo per il recettore CB2, ad altissima affinità (dell'ordine delle picomoli) ed attivo anche per via orale. Un antagonista del recettore CB1 analogo all'SR141716A è l'AM251 il quale contiene un gruppo 4-iodiofenile al posto del 4-clorofenile. (Haller et al, 2004; Pistis et al, 2004; Rodgers et al, 2005).

## MECCANISMO D'AZIONE DEGLI ENDOCANNABINOIDI

Gli endocannabinoidi agiscono come mediatori locali, legandosi ai recettori cannabinoidi. A livello del sistema nervoso centrale, la presenza di alte concentrazioni di endocannabinoidi e dei loro recettori sulle sinapsi GABAergiche e glutamatergiche suggerisce il loro coinvolgimento nella modulazione della trasmissione sinaptica. A differenza degli altri neurotrasmettitori, infatti, gli endocannabinoidi non vengono immagazzinati in vescicole e rilasciati per esocitosi, ma sono sintetizzati su richiesta per clivaggio dei precursori lipidici di membrana e quindi immediatamente rilasciati nello spazio sinaptico (Cadas et al., 1997; Di Marzo et al., 1994). L'eccitazione protratta del neurone pre-sinaptico determina la depolarizzazione del neurone post-sinaptico ove, attraverso un meccanismo mediato dall'apertura dei canali del  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio-dipendenti e la concomitante attivazione dei recettori metabotropi, vengono attivati gli enzimi responsabili della sintesi dell'endocannabinoide a partire dai precursori lipidici. L'endocannabinoide, grazie alla sua alta lipofilia, esce dalla cellula post-sinaptica e attraverso una diffusione retrograda, lega il recettore CB1 del neurone pre-sinaptico. L'attivazione di tale recettore riduce l'ingresso di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  ed il rilascio  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente del neurotrasmettitore. Quando ciò si verifica a livello dei neuroni GABAergici, determina una riduzione dell'inibizione mediata dal GABA, fenomeno che prende il nome di DSI (depolarization-induced suppression of inhibition), mentre quando avviene a livello dei neuroni glutamatergici determina una riduzione dell'eccitazione mediata dal glutammato, fenomeno noto come DSE (depolarization-induced suppression of excitation). A lungo andare, gli effetti degli endocannabinoidi sul rilascio dei neurotrasmettitori possono influenzare il potenziamento a lungo termine (LTP, long-term potentiation) a livello sinaptico, un processo fondamentale per il rimodellamento e consolidamento delle sinapsi. Questo processo è inibito laddove è ridotta la trasmissione eccitatoria mediata dal glutammato, mentre risulta facilitato quando la trasmissione inibitoria GABAergica è inibita.



## 2. CANNABIS E ADOLESCENZA

Secondo le stime riportate dal World Drug Report del 2012 (United Nations Office on Drugs and Crime – UNODC 2012) la cannabis risulta essere la sostanza illecita più ampiamente prodotta ed utilizzata al mondo. I consumatori di cannabis sono circa 224 milioni ed il suo uso risulta più diffuso tra i soggetti di età compresa tra i 15 e i 24 anni (maschi 16,5%, femmine 10,6%). Nonostante il continuo incremento del consumo di cannabis tra gli adolescenti, la comunità scientifica ancora dibatte sull'esistenza di una chiara relazione tra l'uso precoce di cannabis e il rischio di sviluppare disturbi psicotici in età adulta. Generalmente, la maggior parte dei fumatori non sviluppa disturbi psichiatrici, ma una percentuale di individui che sono stati consumatori pesanti di cannabis in adolescenza presenta complicanze quali anomalie cognitive, patologie psicotiche, depressione e il rischio di incorrere nell'uso di altre droghe illecite (Di Forti, 2009). Infatti, sembra che gli effetti della cannabis possano variare in relazione ad un ampio spettro di fattori, quali una predisposizione genetica e fattori ambientali, che rendono un individuo più vulnerabile agli effetti della cannabis (Arseneault et al., 2011).

Prima degli studi condotti da Giedd e collaboratori, la maggior parte degli scienziati riteneva che il cervello degli adolescenti fosse "un prodotto finito".

Anche se già dopo i primi 5 anni di vita il cervello raggiunge il 90% del suo peso adulto (Dekeban, 1978), oggi sappiamo bene che esso si differenzia sia dal punto di vista anatomico che neurochimico da quello dell'adulto, infatti devono ancora compiersi una serie di processi di rimodellamento dei circuiti corticali e limbici, che porteranno poi nell'adulto al completamento dell'acquisizione dei processi cognitivi, decisionali e dei comportamenti sociali (Sisk e Zehr, 2005).

È risaputo che l'adolescenza rappresenta il periodo tra l'infanzia e l'età adulta, che comprende non solo la maturazione riproduttiva, ma anche cognitiva, emotiva e sociale. Infatti, dall'infanzia all'adolescenza, la strategia di sviluppo si sposta dalla produzione di un gran numero di neuroni alla creazione di vie neuronali efficienti (Katz & Shatz, 1996; Cohen-Cory, 2002; Whitford, et al., 2007; Purves et al., 2008; Luna, 2009). Questo scopo è raggiunto mediante meccanismi di "raffinamento" sinaptico (caratterizzato dal rafforzamento di tutte le connessioni importanti per il corretto funzionamento cerebrale e dall'eliminazione delle sinapsi "inutili") nei quali il sistema endocannabinoide sembra giocare un ruolo chiave dato la sua funzione neuromodulatoria e la sua posizione strategica sulle sinapsi glutammatergiche e GABAergiche. Infatti, negli ultimi anni diversi studi hanno sottolineato come il sistema endocannabinoide sia coinvolto nello sviluppo neuronale mediante la modulazione della neurogenesi, del differenziamento neuronale, dell'orientamento assonale e dello sviluppo di alcuni sistemi neurotrasmettitoriali (Galve-Roperh, 2009; Rubino et al., 2014).

Quindi l'adolescenza, insieme al periodo neonatale, rappresenta un passaggio critico per lo sviluppo cerebrale. È dunque possibile che l'esposizione ai cannabinoidi esogeni, durante questa delicata fase di sviluppo, possa alterare il ruolo regolatorio del sistema cannabinoide endogeno causando problemi nei processi di maturazione, con ovvie conseguenze sulle normali funzioni cerebrali. Come appena accennato, l'adolescenza è un importante periodo di sviluppo durante il quale il bambino si trasforma in adulto. Lo sviluppo cerebrale continua durante tutta l'adolescenza e riguarda in particolar modo quelle aree coinvolte nelle funzioni cognitive ed emotive, come la corteccia prefrontale (PFC) (Gogtay et al., 2004). La PFC regola il comportamento emotivo, la motivazione, la capacità di prendere decisioni, di pianificare azioni ed è inoltre coinvolta nello sviluppo della memoria di lavoro attraverso connessioni con le strutture corticali posteriori e subcorticali. La corteccia prefrontale è quindi una delle ultime regioni

a completare il suo sviluppo e durante l'adolescenza va incontro a grossi cambiamenti che includono un incremento della mielinizzazione e del pruning sinaptico (Andersen, 2000; Chambers et al., 2003; Crews et al., 2007). L'attivo rimodellamento di questa area cerebrale durante l'adolescenza potrebbe quindi rappresentare un processo sensibile che i fattori ambientali potrebbero turbare, alterando il normale sviluppo dei circuiti corticali. Infatti, i circuiti della PFC risultano essere molto sensibili agli stimoli neurochimici e ai piccoli cambiamenti dei sistemi neurotrasmettitoriali, dovuti per esempio allo stress, i quali possono produrre grossi effetti sulle funzioni mediate dalla PFC (Amy et al., 2012). In supporto a queste ipotesi, analisi morfologiche del cervello in consumatori di cannabis hanno mostrato una significativa riduzione del volume di materia grigia nelle regioni corticali, ma solo nei casi in cui l'assunzione di cannabis aveva avuto inizio prima dei 17 anni di età (Wilson et al., 2000).

Nelle aree corticali, il recettore CB1 è altamente espresso a livello degli interneuroni GABAergici e nei neuroni piramidali (Marsicano and Lutz, 1999; Hill et al., 2007). Oltre all'azione svolta sulla trasmissione GABAergica, lavori in letteratura hanno dimostrato che la trasmissione glutamatergica dei neuroni piramidali del layer 5 della corteccia prefrontale, uno dei maggiori layer di output della corteccia, è soggetta all'azione inibitoria del segnale mediato dagli endocannabinoidi (Fortin et al., 2007). Il sistema endocannabinoide ha quindi un ruolo omeostatico nel regolare l'eccessiva eccitazione o inibizione neuronale e lo fa modulando continuamente il suo tono endogeno (Marsicano et al., 2003; Katona and Freund, 2008). Il mantenimento di un equilibrio tra la trasmissione sinaptica eccitatoria e quella inibitoria, risulta quindi essenziale per la maturazione funzionale e la stabilità a lungo termine della corteccia prefrontale. È per questo che una forte esposizione al THC, in particolar modo durante una fase così critica come l'adolescenza, potrebbe determinare un'alterazione del sistema endocannabinoide e quindi della sua capacità di regolare l'equilibrio tra il sistema glutamatergico e quello GABAergico portando ad una non corretta maturazione delle reti corticali.

#### STUDI CONDOTTI SULL'UOMO

La cannabis continua ad essere la droga più popolare tra i giovani ed ogni anno si assiste ad una diminuzione dell'età del primo utilizzo. La maggior parte dei

consumatori non riporta reazioni avverse, ma una minoranza va incontro allo sviluppo di disturbi psichiatrici in età adulta. Infatti, un numero sempre maggiore di studi epidemiologici suggerisce che l'abuso di cannabis in adolescenza può aumentare il rischio di sviluppare anomalie cognitive, psicosi, depressione e di incorrere nell'utilizzo di altre sostanze illecite.

*- Aspetti cognitivi*

E' noto che l'uso regolare e continuativo durante la pubertà o comunque entro i 17 anni di cannabis altera negativamente l'apprendimento, la memoria e l'attenzione (Blakemore, 2013). Mentre la comunità scientifica concorda sulla presenza di deficit cognitivi in seguito al consumo di cannabis, ancora dibattuta è la regressione degli effetti a lungo termine durante l'astinenza. Adulti consumatori di cannabis possono migliorare le proprie prestazioni cognitive fino a raggiungere gli stessi livelli dei controlli con un opportuno e prolungato periodo di astinenza (Pope et al., 2002), mentre ricerche fatte sugli adolescenti suggeriscono la presenza di deficit anche dopo mesi dalla fine dell'abuso (Medina et al., 2007). In uno studio recente, misurando l'apprendimento e la memoria di lavoro verbale, Hanson e collaboratori (2010) hanno evidenziato che le prestazioni dei consumatori adolescenti di cannabis, dopo tre giorni di astinenza, peggiorano rispetto ai controlli; mentre recuperano dopo due o tre settimane. Nonostante ciò, i consumatori adolescenti di cannabis sono caratterizzati da deficit dell'attenzione che persistono oltre le tre settimane di astinenza.

Il preciso meccanismo alla base degli effetti negativi della cannabis sulle funzioni cognitive non è ancora del tutto chiaro. Recenti studi hanno dimostrato una stretta associazione tra l'uso cronico di cannabis in adolescenza e alterazioni anatomiche e funzionali nel cervello, come l'asimmetria ippocampale, la diminuzione del volume del vermis posteriore del cervelletto, l'attivazione aberrante di alcune vie di segnale in diverse regioni cerebrali e l'alterazione delle microstrutture della sostanza bianca (Jacobs & Tapert, 2013).

*- Aspetti emotivi*

Numerosi studi indicano l'esistenza di un legame tra consumo di cannabis in adolescenza e la depressione, specialmente nei soggetti di sesso femminile (Chadwick et al., 2013; Lee et al., 2008). La quantità di consumo sembra importante, infatti il rischio di sviluppare disordini depressivi sembra essere



presente solo nei consumatori frequenti (consumo settimanale o giornaliero) (Van Laar et al., 2007). Inoltre il rischio risulta ancora maggiore se il consumo viene iniziato prima dei 17 anni (Hayatbakhsh et al., 2007). Sembra quindi evidente che un consumo precoce e regolare di cannabis comporti un aumentato rischio di sviluppare depressione. In parziale disaccordo, de Graaf e collaboratori (2010), in uno studio condotto in ben 17 paesi, hanno riscontrato solo una associazione di lieve entità tra uso precoce di cannabis e sviluppo di depressione, senza differenze di genere. Tale discrepanza, però, potrebbe essere dovuta alla mancanza di distinzione tra consumo frequente e occasionale di cannabis.

#### - Psicosi

Studi epidemiologici hanno dimostrato che l'uso in età adolescenziale di cannabis aumenta l'incidenza della comparsa di sintomi psicotici più avanti nella vita (Chadwick et al., 2013). In particolare, l'associazione tra l'uso di cannabis ed il successivo sviluppo di psicosi sembra dipendere dall'età in cui inizia il consumo della droga, passando da un fattore due per l'abuso a partire dai 18 anni ad un fattore 4 se l'abuso inizia prima dei 15 anni (Arseneault et al., 2002). Inoltre, tanto più bassa è l'età della prima esposizione alla cannabis tanto prima si avrà l'esordio dei sintomi psicotici, soprattutto nei fumatori frequenti di ceppi di cannabis arricchiti in principio attivo, come lo skunk (Di Forti et al., 2013). La ragione per cui si osservano effetti maggiori in coloro che hanno iniziato precocemente ad abusare di cannabis è ancora poco chiara. Tuttavia, è noto che durante l'adolescenza si verificano modifiche cerebrali significative e l'abuso di droga è in grado di influenzare i circuiti cerebrali coinvolti nella modulazione di funzioni che vanno incontro a processi di maturazione proprio durante questo periodo, come la gratificazione, il processo decisionale, l'attenzione, l'apprendimento, la memoria ed il controllo del comportamento. Inoltre, il sistema degli endocannabinoidi sembra avere un ruolo importante nei processi di maturazione cerebrale presenti nell'adolescenza. L'uso di cannabis in questo periodo può quindi portare ad alterazioni neurobiologiche che possono aumentare il rischio di psicosi.

Naturalmente, non tutti i consumatori di cannabis sviluppano psicosi, indicando l'importanza di fattori con cui l'uso di cannabis può interagire, come la vulnerabilità genetica (ad es. polimorfismo Val108Met delle COMT, o il

polimorfismo Val66Met per BDNF, con la popolazione femminile portatrice di Met più a rischio di un precoce sviluppo di psicosi) e i fattori ambientali (esperienze avverse nell'infanzia) (Chadwick et al., 2013; Decoster et al., 2011; Henquet et al., 2008).

*- Vulnerabilità all'abuso di altre droghe*

Un aspetto estremamente importante nel dibattito sull'uso di cannabis da parte degli adolescenti riguarda la possibilità che questo comportamento possa facilitare il successivo utilizzo di altre sostanze illecite come ad esempio cocaina ed eroina. Questo fenomeno è descritto in letteratura come ipotesi della "droga ponte". In effetti, studi clinici ed epidemiologici sembrano mostrare un nesso tra esposizione ripetuta in età adolescenziale alla cannabis ed aumentato rischio di uso di altri farmaci d'abuso (Chadwick et al., 2013; Rubino et al., 2012). Inoltre, quasi sempre l'abuso di droghe pesanti è preceduto da un consumo di cannabis (Chadwick et al., 2013). Gli studi epidemiologici ed osservazionali, però, non sono in grado di definire una relazione causa/effetto tra uso di cannabis in adolescenza e susseguente abuso di altre droghe, anche perché non è possibile discriminare l'influenza di molti altri fattori quali ad esempio la genetica e l'ambiente. A conferma di questo vi è il fatto che non tutti gli adolescenti che fanno uso ripetuto di cannabis sviluppano dipendenza alle altre droghe, suggerendo quindi la presenza di differenze nello stato di vulnerabilità dei diversi individui. In linea con questa ipotesi, la più alta probabilità di far uso di altre droghe dopo esposizione alla cannabis in adolescenza potrebbe essere interpretata come un effetto principalmente dovuto a condizionamenti ambientali e/o predisposizioni genetiche (Cleveland e Wiebe, 2008). Secondo questa visione il modello che più si avvicina a rappresentare questa associazione non è tanto quello della "gateway hypothesis", ma piuttosto quello della "common liability" (Vanyukov et al., 2012) dove si ipotizza che l'utilizzo di cannabis e di altre droghe è dovuto all'influenza di un fattore comune, che può essere rappresentato da una vulnerabilità individuale dovuta a predisposizione (ad esempio maggiore impulsività, iperattività) o alla frequentazione di un ambiente predisponente e tollerante verso l'uso di sostanze. A supporto di questa ipotesi, la recente revisione di Degenhardt e colleghi (2010) basata sull'analisi di dati provenienti da 17 diverse nazioni, afferma che un precoce inizio di uso di droghe, indipendentemente dal tipo di sostanza, pone a rischio di un

uso successivo di altre droghe, indicando il fattore "età di inizio" come uno dei più importanti nell'insorgenza della dipendenza, insieme alla presenza di disturbi mentali nei soggetti prima dei 15 anni.

Gli studi sull'uomo, in particolare quelli che utilizzano le valutazioni retrospettive, hanno alcune limitazioni a causa della vasta eterogeneità del consumo di cannabis che introduce diversi fattori confondenti quali, ad esempio, il patrimonio genetico, lo status sociale e la cultura. La ricerca su modelli animali potrebbe offrire la possibilità di chiarire l'esistenza di una relazione causa-effetto fra l'abuso di cannabis in adolescenza e lo sviluppo di patologie psichiatriche in età adulta.

Una strategia adottata per cercare di valutare correttamente la relazione tra abuso di cannabis in adolescenza ed insorgenza di patologie psichiatriche è rappresentata dall'uso di modelli animali. Questi consentono di ottenere dati più affidabili ma non sono completamente privi di limiti, primo fra tutti l'incapacità di rappresentare nella loro globalità tutti gli aspetti che caratterizzano patologie complesse come quelle psichiatriche, rendendo alle volte difficile traslare all'uomo i risultati ottenuti sperimentalmente. Anche il sesso degli animali utilizzati è importante in quanto recenti studi hanno dimostrato come il sesso influenzi in modo diverso gli effetti dei cannabinoidi (Craft, 2005; Cahill et al, 2006; Fattore et al., 2007).

#### CONDOTTI SU MODELLI ANIMALI

Gli studi sperimentali che analizzano gli effetti a lungo termine indotti dal trattamento cronico con cannabinoidi in adolescenza sono ancora relativamente pochi ed hanno talvolta prodotto risultati contrastanti, probabilmente a causa di differenze nei parametri sperimentali scelti (es. ceppo di ratti, agonista cannabinoide e dosaggio utilizzati). Nel loro complesso i dati esistenti evidenziano la presenza di sottili cambiamenti nei circuiti cerebrali degli animali adulti in seguito al trattamento con cannabinoidi in adolescenza. I quattro domini su cui si sono focalizzati gli studi sperimentali riguardano la sfera cognitiva, quella emotiva, la comparsa di comportamenti simil-psicotici e la vulnerabilità all'abuso di altre droghe.

### *- Aspetti cognitivi*

Nei roditori il trattamento cronico in adolescenza con cannabinoidi sia naturali che sintetici determina un deficit della memoria di riconoscimento che perdura almeno fino a 30 giorni dopo il termine della somministrazione. L'alterazione è presente in ratti di entrambi i sessi e non si manifesta quando il trattamento viene effettuato in ratti adulti (Renard et al., 2013; Rubino et al., 2012). In parziale disaccordo è il recente lavoro di Abush e Akirav (2012) dove però il trattamento è stato effettuato nella fase finale dell'adolescenza, mentre negli altri studi questo iniziava prima. Poiché l'adolescenza rappresenta un periodo critico per il rimodellamento del sistema nervoso centrale è possibile che il trattamento durante intervalli di tempo differenti possa causare conseguenze diverse. L'apprendimento spaziale non sembra invece essere influenzato dall'esposizione in adolescenza ai cannabinodi naturali o sintetici, sia in ratti maschi che femmine, mentre la memoria spaziale di lavoro è danneggiata in entrambi i sessi (Rubino et al., 2012). Questi dati suggeriscono che l'esposizione alla cannabis in adolescenza produce danni in specifiche componenti della memoria, quali la memoria di lavoro e di riconoscimento. Pochi lavori hanno affrontato il problema dei meccanismi cellulari e molecolari alla base dei disordini cognitivi causati dal trattamento cronico con cannabinoidi in adolescenza, ma sembrano indicare delle modifiche sesso-dipendenti: nelle femmine l'area più alterata sembra essere la corteccia prefrontale mentre nei maschi l'ippocampo (Rubino et al., 2012). La diversa specificità delle aree alterate nei due sessi trova supporto anche nella letteratura dove è dimostrato che maschi e femmine possono usare diversi percorsi neuronali per raggiungere la stessa finalità comportamentale (Andreano & Cahill, 2009).

### *- Aspetti emotivi*

Mentre alcuni autori non hanno osservato alterazioni del profilo d'ansia negli animali pre-trattati con cannabinoidi in adolescenza, altri hanno descritto un effetto ansiolitico (Chadwick et al., 2013). Al contrario tutti i ricercatori hanno riscontrato alterazioni del comportamento sociale in seguito all'esposizione adolescenziale ai cannabinoidi (Chadwick et al., 2013). Nei roditori la riduzione delle interazioni sociali è considerata un comportamento ansiogeno (File & Hyde, 1978), quindi i cannabinoidi, in base al test utilizzato, avrebbero effetti ansiogenici, ansiolitici o nessun effetto. E' però importante ricordare che gli effetti

rilevati col test di interazione sociale spesso non correlano bene con le performance ottenute dagli animali in altri test d'ansia, suggerendo che la riduzione del comportamento sociale potrebbe riguardare domini psicologici rilevanti per altri disordini psichiatrici, come la depressione (Tonissaar et al. 2008). Oltre al ridotto comportamento sociale, altre due fenotipi legati alla presenza di uno stato depressivo nei roditori sono la disperazione comportamentale e l'anedonia. Entrambi i comportamenti sono presenti negli animali pretrattati in adolescenza con cannabinoidi naturali o sintetici, indicativi della presenza di un quadro simil-depressivo negli animali adulti (Bambico et al., 2010; Realini et al., 2011; Rubino et al., 2008). Il quadro comportamentale è accompagnato da alterazioni di parametri biochimici collegati alla depressione, quali alterata attivazione di CREB in specifiche aree cerebrali e una diminuita neurogenesi nel giro dentato dell'ippocampo (Rubino, et al. 2008; Realini et al., 2011). E' inoltre presente una ridotta attività dei neuroni serotoninergici nel rafe dorsale, e un'iperattività dei neuroni noradrenergici nel locus ceruleo (Bambico, et al., 2010). E' interessante notare che il quadro simil-depressivo non si sviluppa quando la somministrazione cronica di cannabinoidi viene eseguita negli animali adulti, suggerendo così una vulnerabilità età-dipendente (Bambico et al., 2010; Realini et al., 2011).

#### *- Psicosi*

Gli effetti a lungo termine dell'esposizione adolescenziale ai cannabinoidi sulla sfera cognitiva ed emotiva, domini alterati nella schizofrenia, sono appena stati discussi, sui sintomi positivi. Per quanto riguarda i sintomi positivi come le allucinazioni uditive e la delusione sono propriamente umani, per cui i modelli animali si focalizzano su due principali categorie di comportamento: l'iperattività locomotoria e le alterazioni nella prepulse inhibition (PPI). La PPI è considerata una misura del "gating sensorimotorio" e risulta ridotta nei pazienti schizofrenici (Braff et al., 2001). Il fatto che la PPI sia ugualmente misurabile nei roditori e negli umani, permette di traslare all'uomo i risultati ottenuti nei modelli animali (Geyer, 2008). Gli unici due articoli presenti in letteratura riportano la presenza di un deficit nella PPI negli animali adulti esposti ai cannabinoidi durante l'adolescenza (Schneider & Koch 2003; Wegener & Koch, 2009). Il concetto di testare l'iperattività locomotoria nei modelli animali come sintomo di psicosi si basa sull'osservazione che un'aumentata attività dopaminergica nei roditori

porta ad un incremento dell'attività motoria e cambiamenti nell'attività dopaminergica sembrano essere associati ai vari gradi della sintomatologia schizofrenica (Van den Buuse 2010). Pochi e confusi sono i risultati sull'attività locomotoria basale negli animali adulti pre-esposti ai cannabinoidi in adolescenza. Alcuni studi non hanno trovato significative alterazioni (Biscaia, et al. 2003; Rubino, et al. 2008), mentre altri hanno evidenziato la presenza di iperattività locomotoria (Wegener & Koch, 2009). Un recente lavoro ha riportato la presenza di sensibilizzazione agli effetti locomotori della fenciclidina nei ratti femmina adulti esposti al THC in adolescenza, correlata ad una maggiore attivazione neuronale nella corteccia prefrontale e nello striato (Zamberletti et al., 2013). In generale, i dati disponibili sembrano supportare l'ipotesi che l'esposizione in adolescenza ai cannabinoidi potrebbe rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo di segni simil-psicotici in età adulta, soprattutto quando si considera l'ipotesi dei due "hit" della schizofrenia. Secondo tale ipotesi, fattori genetici e/o ambientali vanno a disturbare le prime fasi di sviluppo del sistema nervoso centrale, creando una vulnerabilità ad un secondo "hit" che può portare all'insorgenza dei sintomi schizofrenici. In linea con questa ipotesi, la combinazione di lesioni neonatali della corteccia prefrontale o la somministrazione cronica di fenciclidina (una manipolazione che porta allo sviluppo di segni comportamentali simil-schizofrenici negli animali) con la somministrazione di cannabinoidi durante il periodo adolescenziale è in grado di indurre deficit comportamentali maggiori (Schneider & Koch, 2007; Vigano, et al., 2009). Quando invece è stato considerato un fattore genetico, è stata descritta sia un'aumentata che una diminuita sensibilità al THC. In particolare una interazione positiva è stata dimostrata nei topi ko per COMT, mentre non sempre univoca è l'interazione nei topi eterozigoti per la neuregulina 1 (O'Tuathaigh et al., 2013).

- Vulnerabilità all'abuso di altre droghe

Molti, ma non tutti i gruppi di lavoro che hanno studiato sperimentalmente l'interazione tra abuso di cannabis in adolescenza ed utilizzo successivo di psicostimolanti ed oppiacei ha riportato un effetto facilitatorio del trattamento con cannabinoidi in adolescenza sul comportamento di autosomministrazione o sulle proprietà di rinforzo di tali farmaci (Chadwick et al., 2013). La ragione di questa discrepanza può essere spiegata dal recente lavoro di Cadoni e

collaboratori (2013) che dimostra l'importanza del background genetico nella risposta alla eroina di animali adulti esposti al THC in adolescenza.

In generale, la maggior parte dei lavori sopra menzionati si è concentrata sullo studio delle alterazioni comportamentali presenti in età adulta indotte dalla somministrazione di cannabinoidi durante l'adolescenza, e solo raramente ha preso in considerazione le basi molecolari di questo alterato comportamento, o lo stato di tutto il sistema endocannabinoide, anche se è ben noto che questo sistema svolge un ruolo importante nel modulare gli stati emotivi, le funzioni cognitive e la gratificazione (Pacher et al., 2006).

L'ultimo lavoro pubblicato dal nostro laboratorio (Rubino et al., 2014) si è occupato di investigare tutti questi aspetti e ha dimostrato come a livello della corteccia prefrontale siano presenti, durante il periodo che va dall'adolescenza all'età adulta, cambiamenti fisiologici nei diversi componenti del sistema endocannabinoide in termini di densità e funzionalità del recettore CB1 e dei livelli di AEA e 2-AG. Il trattamento cronico con THC in adolescenza altera l'andamento di tali fluttuazioni e questo si ripercuote sulla funzionalità della corteccia prefrontale adulta. Infatti l'LTD, una forma di plasticità sinaptica mediata dagli endocannabinoidi, risulta essere ridotto negli animali adulti pre-esposti al THC. Inoltre, in seguito all'esposizione adolescenziale al THC la densità delle spine dei dendriti basali distali si mantiene a livelli significativamente inferiori rispetto ai valori controllo ed il fisiologico processo di maturazione dei recettori AMPA e NMDA viene alterato, determinando la presenza in età adulta di sinapsi glutamatergiche immature e maggiormente eccitabili. Alla luce di questi risultati possiamo quindi affermare che l'esposizione adolescenziale al THC altera la corretta maturazione delle terminazioni glutamatergiche e determina un eccessivo pruning delle sinapsi nei neuroni piramidali, compromettendo la funzionalità della corteccia prefrontale (Rubino et al., 2014). Queste alterazioni rappresentano parte dei meccanismi molecolari alla base dello sviluppo di patologie psichiatriche in età adulta, dopo assunzione di cannabis in adolescenza. Inoltre, in un precedente lavoro, Zamberletti e collaboratori (2013) hanno dimostrato come l'esposizione al THC in adolescenza si ripercuote negativamente sulla maturazione del sistema neurotrasmettitoriale GABAergico, conferendo così una maggiore vulnerabilità allo sviluppo di sintomi depressivo-psicotici in età adulta. In supporto a questi dati, anche il lavoro pubblicato da

Cass et al., (2014) ha dimostrato che l'esposizione adolescenziale ai cannabinoidi, ma non quella in età adulta, porta ad una down-regolazione della trasmissione GABAergica sottolineando ancora una volta la maggior vulnerabilità del cervello adolescente agli effetti avversi del THC.

Ad oggi, i meccanismi alla base di questa maggior vulnerabilità non sono ancora noti. Considerando il numero sempre maggiore di lavori che depone a favore del coinvolgimento dei meccanismi epigenetici nello sviluppo di patologie psichiatriche (Renthall et al., 2009) e che le alterazioni comportamentali indotte dall'esposizione adolescenziale al THC si sviluppano dopo 30 giorni dall'ultima somministrazione, diventa di primaria importanza l'investigazione dei meccanismi epigenetici dato che rappresentano i principali candidati coinvolti nella mediazione degli effetti a lungo termine indotti dall'assunzione di droghe.

### 3. EPIGENETICA

Il termine "epigenetica" fu coniato per la prima volta nel 1940 dal biologo Conrad Waddington, il quale lo usò per spiegare come genotipi identici potessero dare origine ad un'ampia gamma di fenotipi durante il processo di sviluppo (Waddington, 1957). Col tempo questo concetto si è evoluto ed oggi, con il termine epigenetica, ci si riferisce a tutte quelle "modificazioni dell'espressione genica potenzialmente ereditabili che non alterano la sequenza nucleotidica del DNA" (Holliday & Pugh, 1975; Chambon, 1978; Jaenisch & Bird, 2003). Essendo i meccanismi epigenetici alla base della regolazione genica, questi risultano essere dei candidati ideali per lo studio delle patologie psichiatriche.

Recentemente è emerso che alcuni disturbi neurologici e psichiatrici sono causati da rare mutazioni genetiche che colpiscono enzimi coinvolti nel rimodellamento cromatinico. Per cromatina si intende il complesso formato da DNA, istoni e proteine non istoniche. Infatti, nel nucleo il DNA si avvolge attorno agli ottameri istonici, formati da due copie di ciascun istone H2A, H2B, H3 e H4 (Luger & Richmond, 1998), che poi si superavvolgono a formare una struttura super-condensata. Una quinta molecola, l'istone H1, compatta i nucleosomi in strutture di ordine superiore. Siccome il DNA è strettamente associato agli istoni e spesso incorporato all'interno dei superavvolgimenti della cromatina



(Felsenfeld & Groundine, 2003), esistono meccanismi cellulari che modificano e rimodellano la struttura cromatinica per consentire l'espressione coordinata di specifici programmi trascrizionali e il silenziamento di altri.

#### 4. MECCANISMI EPIGENETICI:

##### *METILAZIONE DEL DNA*

Per metilazione del DNA si intende la metilazione enzimatica delle citosine in posizione 5, che risulta in un gruppo metilico sporgente nel solco maggiore del DNA (Newell-Price et al., 2000). Nei mammiferi, queste metil-citosine si presentano principalmente nelle sequenze palindromiche 5'-CpG-3' e non interferiscono con i normali legami ad idrogeno con la base complementare (guanina). La distribuzione dei dinucleotidi CpG nel DNA dei mammiferi è irregolare, dal momento che si verifica alle più alte concentrazioni in regioni chiamate isole CpG; le isole CpG coincidono con il 50-60% dei promotori di geni umani e sono tipicamente metilate in misura molto minore di quanto lo siano i dinucleotidi CpG che si trovano al di fuori delle isole (Wang & Leung, 2004). La metilazione dei dinucleotidi CpG nelle regioni promotrici dei geni è generalmente considerata in grado di reprimere la trascrizione grazie alla sua capacità di impedire il legame dei fattori di trascrizione alla loro sequenza bersaglio. Circa il 3% di tutte le citosine del genoma umano sono metilate (Nafee et al., 2008), e la corretta metilazione di queste basi è richiesta per il differenziamento cellulare, per l'imprinting genetico, per la soppressione degli elementi ripetitivi e per l'inattivazione del cromosoma X (Bird, 2008). La metilazione del DNA è catalizzata dalle DNA metil-transferasi (DNMTs), che trasferiscono un gruppo metile dall'S-adenosilmetionina (SAM) ai residui di citosina dei dinucleotidi CpG. Le DNMT sono una famiglia di enzimi che include DNMT1, DNMT2, DNMT3a e DNMT3b (Weber & Schubeler, 2007); questi enzimi giocano ruoli diversi: DNMT1 mantiene il pattern di metilazione durante la replicazione del DNA, mentre DNMT3a e DNMT3b sembrano catalizzare la metilazione de novo del doppio filamento di DNA precedentemente non metilato (Newell-Price et al., 2000; Kim et al., 2009). DNMT2, invece, è in grado di metilare l'RNA (Goll et al., 2006).

## MODIFICAZIONI ISTONICHE

Le modificazioni istoniche rappresentano un meccanismo epigenetico che agisce, come la metilazione del DNA, sul grado di compattezza della cromatina. Gli istoni sono delle proteine basiche (H1, H2A, H2B, H3 e H4) che formano l'ottamero attorno al quale si avvolge il DNA per formare il nucleosoma, l'unità fondamentale della cromatina. La regione N-terminale degli istoni può essere soggetta a numerose modifiche post-traduzionali quali acetilazioni, metilazioni, fosforilazioni, ADP-ribosilazioni e ubiquitinazioni. Alcune di queste modificazioni (es. H3K9me e H3K27me) rendono la cromatina più compatta (eterocromatina), e quindi escludono l'apparato trascrizionale, mentre altre modificazioni (es. H3K4me; H3K9ac) rilassano la cromatina (eucromatina) rendendo possibile la trascrizione del gene; in questo modo le modificazioni istoniche sono in grado di spegnere o accendere l'espressione genica.

### Acetilazione istonica

L'acetilazione dei residui di lisina istonici riduce le interazioni elettrostatiche tra le proteine istoniche e il DNA, rilassando la struttura cromatinica e consentendo l'accesso ai fattori di trascrizione sul DNA (Kouzarides, 2007). L'acetilazione istonica è, perciò, associata ad attivazione trascrizionale; al contrario, la sua mancanza viene associata a repressione genica. L'acetilazione istonica è un processo dinamico, controllato da specifici enzimi che aggiungono o rimuovono i gruppi acetile. Sono note più di 12 iston-acetiltransferasi (HATs), che usano acetil-coenzima A come co-substrato e possono acetilare, oltre agli istoni, anche proteine non istoniche (come i fattori di trascrizione) (Doi et al., 2006; Kawasaki et al., 2000). Le iston-deacetilasi (HDACs) rimuovono i gruppi acetile dagli istoni e sono divise in quattro classi. Le HDAC di classe I (HDAC 1, 2, 3 e 8) sono ubiquitariamente espresse e probabilmente mediano la maggior parte dell'attività deacetilasica nelle cellule. Le HDAC di classe II (HDAC 4, 5, 7, 9 e 10) sono espresse solo in specifici tessuti come il cuore e il cervello (Chawla et al., 2003). Mentre le HDAC di classe II possono deacetilare gli istoni, esse sono enzimi meno efficienti delle HDAC di classe I, e possono anche deacetilare altri substrati cellulari (Fischle et al., 2002). Le HDAC di classe III (sirtuine) sono diverse dalle altre HDACs e sono state implicate nella regolazione della durata della vita e nel metabolismo (Haigis & Guarente, 2006).

### Metilazione istonica

La metilazione istonica può essere associata sia ad attivazione sia a repressione trascrizionale, in maniera dipendente dal particolare residuo modificato e dal grado di metilazione. Sia i residui di lisina che quelli di arginina possono essere metilati da varie iston-metiltransferasi (HMTs), che usano l'S-adenosilmetionina come co-substrato. I residui metilici vengono rimossi dalle iston-lisina-demetilasi (HDMs). Le HMTs e le HDMs hanno anche attività su proteine non istoniche (Rice & Allis, 2001). A differenza dell'acetilazione, la metilazione non altera la carica dei residui bersaglio; tuttavia, può modificare ampiamente il profilo sterico e le potenziali interazioni molecolari attraverso l'aggiunta di gruppi mono-, di- o trimetilici. Tale modificazione rende ogni sito capace di reclutare co-regolatori specifici ed esercitare diversi effetti sull'attività trascrizionale. Ad esempio, sui promotori genici, la trimetilazione H3K4 è associata ad attivazione genica, mentre la trimetilazione H3K9 o H3K27 risulta repressiva (Maze et al., 2010).

### Altre modificazioni istoniche

La fosforilazione istonica è generalmente associata all'attivazione trascrizionale. Uno dei siti di fosforilazione più noti è la serina 10 dell'istone H3. Ci sono diverse protein chinasi nucleari e fosfatasi note che regolano la fosforilazione istonica (Kouzarides, 2007). Ulteriori modificazioni istoniche note, ma poco comprese, includono l'ubiquitinazione, la sumoilazione e l'ADP ribosilazione (Gibney & Nolan, 2010; Borrelli et al., 2008). La modificazione di un istone può anche influenzare la successiva alterazione degli istoni all'interno dello stesso nucleosoma. Il livello di complessità nel numero quasi infinito di possibili combinazioni delle varie modificazioni su molteplici residui delle code istoniche e l'introduzione di subunità varianti, ha portato alla proposta di un "codice istonico" la cui "lettura" da parte di diverse proteine interagenti con gli istoni è essenziale per una corretta regolazione dell'espressione genica (Strahl & Allis, 2000; Jenuwein & Allis, 2001).

## 5. MODIFICAZIONI EPIGENETICHE NEI PRINCIPALI DISTURBI PSICHIATRICI

Attraverso lo studio dei marker epigenetici si può capire se un gene è attivamente trascritto o silenziato durante un particolare stadio della patologia. In questo modo, l'epigenetica può fornire le basi per determinare gli stati trascrizionali e permettere l'identificazione di geni e proteine implicati nelle patologie neuropsichiatriche. Inoltre, lo studio dei meccanismi epigenetici potrebbe fornire una valida teoria in grado di collegare i fattori genetici con i diversi fattori ambientali e potrebbe quindi aiutarci a comprendere l'eziologia delle diverse patologie neuropsichiatriche.

### DEPRESSIONE

La depressione è una condizione psicologica grave che si presenta con sintomi di ampio spettro che includono umore depresso, perdita di interesse o di piacere, sentimenti di colpa o bassa autostima, basso consumo energetico e scarsa concentrazione (Krishnan & Nestler, 2008; World Health Organization. Depression, 2009). Oltre 121 milioni di persone nel mondo ne sono affette (World Health Organization. Depression, 2009) e recenti studi hanno riportato che nelle vittime di suicidio sono presenti alterazioni di marcatori epigenetici, suggerendo un legame tra l'epigenetica e la depressione (Autry & Monteggia, 2009). Si è infatti osservato che, a livello della corteccia, l'espressione delle DNMT3B risulta essere incrementata nei soggetti suicidi rispetto ai controlli che sono morti improvvisamente per cause che non comportano alcuna patologie del sistema nervoso centrale (Poulter et al., 2008). È stato quindi ipotizzato che l'up-regolazione delle DNMT3B potrebbe contribuire all'ipermetilazione del promotore del recettore del GABA-A e questo potrebbe spiegare la diminuzione dei livelli di espressione di tale recettore nei soggetti che hanno commesso suicidio (Poulter et al., 2008).

Anche il fattore neurotrofico BDNF ed il suo recettore (TrkB) risultano essere ridotti in questi soggetti (Dwivedi et al., 2003), così come l'mRNA di TrkB e della sua variante TrkB.T1. Inoltre, le regioni promotore per questo gene risultano essere ipermetilate, suggerendo che alterazioni dello stato di metilazione del DNA potrebbero essere responsabili della diminuzione dell'espressione genica di TrkB (Ernst et al., 2009). Studi condotti su ratti, hanno dimostrato che lo stress indotto dal protocollo di immobilizzazione acuta induce una riduzione dei livelli di

acetilazione istonica negli esoni per BDNF, con una corrispondentemente riduzione dei livelli del suo trascritto (Fuchikami et al., 2009). Invece, nei topi sottoposti a stress cronico indotto dal paradigma di sconfitta sociale (un modello animale di depressione) la riduzione del messaggero di BDNF è associata ad aumento dei livelli di H3K27me2 (marker di repressione trascrizionale) nel suo promotore (Tsankova et al., 2006). La repressione genica indotta dallo stress e la riduzione dei livelli di BDNF vengono recuperati dal trattamento cronico (non acuto) con gli antidepressivi (Tsankova et al., 2006). Tuttavia, l'incremento di H3K27me2 persiste anche settimane dopo la cessazione dello stress e non viene revertito dal trattamento con antidepressivi. Questo marchio epigenetico potrebbe quindi rappresentare un segno duraturo della repressione dei promotori di BDNF indotta dallo stress cronico. Tuttavia, anche se il trattamento cronico con gli antidepressivi non è in grado di ridurre i livelli di H3K27me2 sul promotore di BDNF, sembra revertire la repressione del gene per BDNF attraverso incremento dei livelli di acetilazione dell'istone H3, o attraverso l'incremento della metilazione H3K4 (marker di attivazione trascrizionale).

Pertanto, i farmaci in grado di revertire - o superare - i cambiamenti epigenetici associati alla depressione possono avere un grande potenziale come nuova categoria di farmaci per il trattamento della depressione (Plazas-Mayorca & Vrana, 2011).

## SCHIZOFRENIA

La schizofrenia (SZ) è un disturbo mentale che colpisce l'1% degli adulti negli Stati Uniti (Snyder & Murphy, 2008). È caratterizzata da sintomi psicotici, tra cui deliri, allucinazioni e disturbi del pensiero, così come dal ritiro sociale, dalla mancanza di motivazione e da apatia generale (Graff J & Mansuy, 2009). Sebbene le cause alla base della SZ non siano ancora note, evidenze sperimentali suggeriscono il coinvolgimento della metilazione del DNA nella patogenesi di questa patologia. Dati presenti in letteratura mostrano che i livelli di mRNA della relina, un proteina della matrice extracellulare implicata nella migrazione neuronale e nella SZ, sono significativamente ridotti nel tessuto cerebrale di pazienti schizofrenici; questa diminuzione è correlato con un aumento dei livelli delle DNMT1 (Chen et al., 2002; Costa et al., 2002; Akbarian et al., 2009). Ciò suggerisce che l'ipermetilazione del DNA nella regione promotore del gene che codifica

per la relina può essere responsabile della sua minore espressione nei pazienti SZ. Inoltre, il trattamento con gli inibitori delle HDAC aumenta lo stato di metilazione di tale promotore sia in colture cellulari che in vivo. Questo suggerisce che la metilazione del DNA e l'acetilazione degli istoni sono responsabili del controllo esercitato sull'espressione della relina e potrebbero quindi contribuire alla regolazione di altri geni coinvolti nella SZ (Chen et al., 2002).

Anche la disregolazione epigenetica di altre proteine come le catecol-O-metiltransferasi legate alla membrana (MB-COMT) e la glutammato decarbossilasi 67 (GAD67) sembra essere implicata nella SZ. Infatti, i risultati ottenuti dall'analisi di campioni cerebrali post-mortem dimostrano che, a livello del lobo frontale dei pazienti SZ, si osserva un'ipometilazione del promotore delle MB-COMT accompagnata da un parallelo aumento dei livelli di trascrizione delle MB-COMT (Abdolmaleky et al., 2008). Quindi questi risultati sembrano suggerire che l'over-espressione delle MB-COMT mediata dall'ipometilazione del loro promotore potrebbe aumentare la degradazione della dopamina nel lobo frontale (Abdolmaleky et al., 2006). Inoltre, l'analisi post mortem di campioni ottenuti da pazienti SZ ha mostrato una riduzione dell'mRNA di GAD67 e della relativa proteina. Questa riduzione è stata correlata, oltre all'ipermetilazione del DNA (Kundakovic et al., 2007), con l'ipermetilazione della H3K27 (marker associato a repressione trascrizionale), e con l'ipometilazione della lisina 4 sull'istone H3 (H3K4, marker associato ad attivazione trascrizionale) a livello della regione promotore del gene codificante per la GAD67 (Huang et al., 2007). Recentemente, è stato inoltre dimostrato che la somministrazione degli inibitori delle HDAC sono in grado di riattivare la trascrizione della relina e di GAD67 ad una dose paragonabile a quella degli inibitori delle DNMT (Kundakovic et al., 2009). Questi risultati suggeriscono la possibilità di utilizzare farmaci epigenetici, singolarmente o in combinazione, come delle nuove potenziali terapie per ridurre i deficit proteici e i sintomi clinici associati alla SZ.

## TOSSICODIPENDENZA

La tossicodipendenza è una patologia cronica recidivante in cui la motivazione alla ricerca e al consumo di droghe diventa compulsivo, nonostante le conseguenze negative (Koob & Le Moal, 1997). Le droghe d'abuso - quali cocaina, eroina e metanfetamine - alterano il normale circuito del reward che

comprende il sistema dopaminergico mesolimbico (Tsankova et al., 2007). La dipendenza non si verifica immediatamente dopo l'esposizione a tali sostanze d'abuso, ma piuttosto implica cambiamenti neurali che si sviluppano nel corso del tempo (Kauer & Malenka, 2007). Tuttavia, si è osservato che anche dopo una somministrazione acuta di cocaina si verifica un aumento rapido dell'acetilazione dell'istone H4 (marker di attivazione) in geni noti per essere coinvolti nei comportamenti legati alla cocaina. Questo aumento globale di acetilazione dell'istone H4 è accompagnato da un concomitante incremento della fosforilazione e dell'acetilazione dell'istone H3 nello striato (Kumar et al., 2005). Inoltre, sono state osservate alterazioni dei livelli di acetilazione sull'istone H3 in seguito all'auto-somministrazione di cocaina che persistono per lungo tempo dopo la sospensione della droga (Freeman et al., 2008). È interessante notare che l'esposizione alla cocaina induce anche un aumento globale della trimetilazione della H3K9 (marker di repressione trascrizionale), e l'inibizione della istone-metiltransferasi (HMTase) G9a, che si traduce in una diminuzione dei livelli di H3K9me3, potenzia la risposta comportamentale alla cocaina (Maze et al., 2010). È quindi possibile che l'aumento della H3K9me3 possa rappresentare un meccanismo di compensazione messo in atto dall'organismo per controbilanciare gli effetti negativi dell'iperacetilazione degli istoni indotti dall'esposizione alla cocaina.

Nel loro insieme questi dati indicano che le modificazioni epigenetiche sono fortemente coinvolte nelle patogenesi delle patologie psichiatriche, come la depressione, la schizofrenia e l'abuso di droghe. È però necessario ulteriore lavoro per capire come i cambiamenti di tali modificazioni partecipino allo sviluppo di queste patologie.

*SCOPO*



## SCOPO

Studi condotti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che ratti femmine trattati cronicamente durante il periodo adolescenziale (35-45 post natal day o PND) con dosi crescenti dell'ingrediente psicoattivo della cannabis, il delta-9-tetraidrocannabinolo (THC), sviluppano in età adulta un fenotipo simil depressivo-psicotico. È importante sottolineare che, quando lo stesso trattamento viene condotto in età adulta, non induce nessuna alterazione comportamentale né biochimica riconducibile a tale fenotipo, suggerendo quindi che l'adolescenza rappresenta un periodo particolarmente vulnerabile agli effetti avversi della cannabis. Tuttavia la neurobiologia di questa vulnerabilità rimane ancora poco chiara.

Effetti come quelli indotti dal THC, che si sviluppano nel tempo e permangono anche a lungo, spesso richiedono cambiamenti dell'espressione genica. È noto che un ruolo determinante nel modificare l'espressione genica è rivestito dai meccanismi epigenetici. Infatti, un numero sempre maggiore di lavori dimostra il coinvolgimento dei meccanismi epigenetici nell'eziologia delle patologie psichiatriche.

Sulla base di queste premesse il primo obiettivo della presente tesi sarà quello di valutare se il trattamento cronico con THC in adolescenza è in grado di indurre modificazioni epigenetiche a livello della corteccia prefrontale (PFC). Più precisamente focalizzeremo la nostra attenzione sulle modificazioni istoniche.

Per raggiungere questo obiettivo ratti femmine adolescenti (PND 35) del ceppo Sprague-Dawley verranno trattati due volte al giorno, per 11 giorni, con iniezioni intraperitoneali (ip) di dosi crescenti di  $\Delta^9$ -THC: 2.5 mg/kg (35-37 PND), 5 mg/kg (38-41 PND), 10 mg/kg (42-45 PND), o del rispettivo veicolo. Questo protocollo di trattamento mima un forte abuso di cannabis in una finestra temporale incentrata sulle media adolescenza. Alla fine del trattamento gli animali verranno sacrificati e le PFC prelevate. Da questi tessuti verranno preparati gli estratti istonici su cui condurre i saggi di Western blot volti a valutare alcune delle modificazioni epigenetiche che risultano essere più coinvolte nello sviluppo delle malattie psichiatriche. Indagheremo in particolare le modificazioni dell'istone H3, tra cui le metilazioni della lisina 9 e 27 (marker di repressione genica) e le

acetilazioni della lisina 9 e 14 (marker di attivazione genica). Per valutare il time-course di tali modificazioni i saggi verranno condotti a 2, 24 e 48 ore dalla fine del trattamento.

A scopo comparativo, lo stesso schema di trattamento e le stesse analisi verranno condotte in animali adulti (75-85 PND).

Dato che le modificazioni epigenetiche si riflettono sulla trascrizione genica, il secondo scopo della seguente tesi sarà quello di valutare se il trattamento cronico con THC è in grado di indurre alterazioni trascrizionali a livello della PFC degli animali adolescenti. Dato che l'evento biologico che caratterizza il cervello adolescente è l'intenso rimodellamento sinaptico e che il sistema endocannabinoide sembra giocare un ruolo importante nel controllo dei meccanismi di plasticità sinaptica, verranno condotti saggi di Real-Time PCR per valutare il profilo di espressione di geni del sistema endocannabinoide e di geni direttamente o indirettamente coinvolti nei processi di plasticità sinaptica. Più specificatamente, l'utilizzo di un array a 96 pozzetti ci permetterà di valutare geni del sistema endocannabinoide (Cnr1, Faah, Mgl1, Ppara e Pparg), geni appartenenti al sistema glutammatergico (Gria1, Gria2, Grin1, Grin2a, Grin2b, Grm1, Grm2, Grm3 e Grm5), GABAergico (Gabbr1, gabbr2, Gabra1, gabra2, Gabrb1, Gad1 e Abat) e serotoninergico (Htr2a), di geni codificanti per enzimi coinvolti nelle modificazioni epigenetiche (Sirt1) e codificanti per proteine direttamente coinvolte nei processi e nelle pathway di rimodellamento sinaptico (Dlg4, Bdnf, Ntrk12, Camk2a, Camk2g, Pdyn, Prkaca, Nos1, Creb1, Homer1, Pick1, Synpo, Crebbp, Arc, Reln e Adcy1).

Per studiare il time-course delle possibili alterazioni trascrizionali e la loro persistenza, i saggi verranno condotti a 2, 24 e 48 ore dall'interruzione del trattamento e al PND 75.

Sempre a scopo comparativo, lo studio del profilo genico verrà condotto anche negli animali adulti.

Il passo successivo sarà quello di valutare, a livello della PFC (tramite saggi di Western Blot), se l'esposizione adolescenziale al THC sia in grado di alterare i livelli

degli enzimi responsabili delle modificazioni istoniche alterate in seguito al trattamento.

Infine, in base ai risultati ottenuti nel punto precedente, l'ultimo obiettivo della presente tesi sarà quello di somministrare un farmaco in grado di modulare l'attività dell'enzima maggiormente coinvolto nel produrre le modifiche istoniche indotte dal THC per investigare il suo ruolo nello sviluppo fenotipo simil depressivo-psicotico indotto dall'esposizione adolescenziale al THC.

Nell'insieme questo studio ci permetterà di valutare non solo le possibili modificazioni epigenetiche indotte dal trattamento con THC in adolescenza, ma anche le conseguenti alterazioni della trascrizione di geni che potrebbero essere responsabili del fenotipo simil depressivo-psicotico. I risultati che otterremo ci aiuteranno a comprendere gli eventi molecolari alla base delle patologie psichiatriche a cui sono maggiormente esposti gli adolescenti che fanno un uso pesante di cannabis.

*MATERIALI&*

*METODI*

## MATERIALI E METODI

### ANIMALI

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando ratti femmine del ceppo Sprague-Dawley (Charles River, Calco, Italia) del peso medio di 90-110 grammi (28 PND) e di 200-220 grammi (70 PND) all'inizio del trattamento, alimentati con dieta a pellets, acqua ad libitum e stabulati in condizioni standard ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $60\pm 5\%$  d'umidità, dodici ore di illuminazione artificiale diurna) in gruppi di cinque animali per gabbia.

I protocolli sperimentali sono stati approvati come richiesto dal Decreto Italiano Governamentale no. 94/2000-A. Tutte le procedure hanno seguito le direttive della Comunità Europea che regola la ricerca con gli animali. Il numero di animali usati e le loro sofferenze sono stati minimizzati.

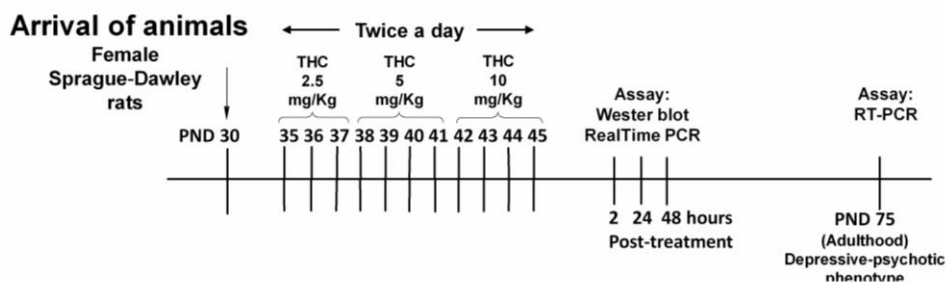
### FARMACI E TRATTAMENTI

Per condurre gli esperimenti della presente tesi sono stati utilizzati i seguenti farmaci:

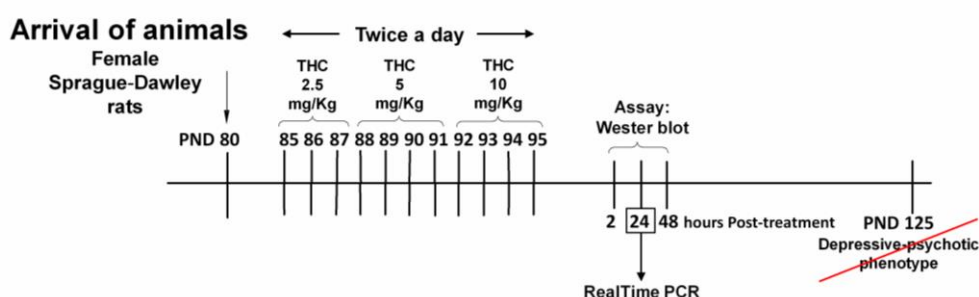
- Il  $\Delta 9$ -tetraidrocannabinolo (THC), generosamente donato dalla GW Pharmaceutical (Salisbury, UK), disciolto in etanolo, cremophor e soluzione fisiologica in rapporto 1:1:18.

Dopo un periodo di stabulazione di 7 giorni, i ratti sono stati randomizzati in due gruppi sperimentali: il primo gruppo è stato trattato con l'agonista cannabico naturale  $\Delta 9$ -THC, il secondo con il rispettivo veicolo (Cremophor, etanolo e soluzione salina, in proporzioni 1 : 1 : 18). Per gli animali adolescenti il trattamento cronico è iniziato 35 giorni dopo la nascita (35 PND) ed è terminato 45 giorni dopo la nascita (45 PND); i ratti sono stati trattati due volte al giorno con iniezioni intraperitoneali (ip) di dosi crescenti di THC: 2,5 mg/Kg (35-37 PND), 5 mg/Kg (38-

### Schedule adolescent THC treatment



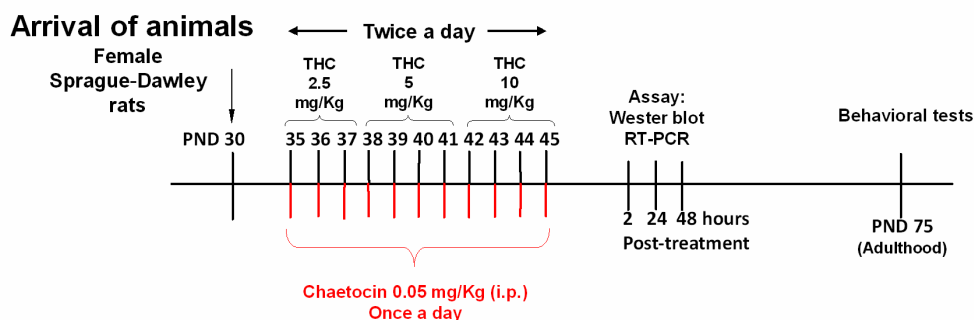
### Schedule adult THC treatment



41 PND), 10 mg/Kg (42-45 PND), o del rispettivo veicolo. Lo stesso schema di trattamento è stato effettuato per gli animali adulti a partire da 75 PND.

- Chaetocin acquistata dalla Cayman Chemical Company (Michigan, USA) è stata disciolta in DMSO, Tween-80 e fisiologica in rapporto 1: 1 : 8. La sostanza è stata somministrata per via intraperitoneale (i.p) alla dose di 0.05 mg/Kg. Un secondo gruppo di animali è stato quindi co-trattato con THC e Chaetocin durante il periodo adolescenziale come riportato nella figura sottostante.

### Schedule adolescent co-treatment



## SAGGI BIOCHIMICI E MOLECOLARI:

### PRELIEVO DEL TESSUTO E RACCOLTA DELLE AREE CEREBRALI

Gli animali sono stati sacrificati ed i loro cervelli prelevati 2, 24 e 48 ore dopo l'ultima somministrazione di THC.

Per i saggi biochimici i cervelli sono stati rapidamente rimossi e le Cortecce Prefrontali, su cui si effettueranno i saggi, vengono prelevate mediante dissezione regionale seguendo la metodica di Heffner utilizzando un blocchetto in alluminio (Rodent Brain Matrix, ASI instrument, Warren, MI USA) che permette di ottenere sezioni cerebrali di 1mm di spessore. Nella sezione di interesse, identificata mediante l'ausilio dell'atlante di Paxinos e Watson (1986), il prelievo dell'area viene effettuato sia a carico dell'emisfero destro che sinistro. Le aree cerebrali così ottenute vengono poi congelate in azoto liquido e conservate a -80°C fino all'utilizzo.

### PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI PROTEICI TOTALI E ISTONICI

Il giorno dell'estrazione, l'area prescelta per i nostri esperimenti in laboratorio, ossia la Corteccia Prefrontale, viene posta in un'adeguata quantità di buffer di lisi (1:10 w/v) mantenuto in ghiaccio, così composto: 50 mM Tris HCl pH 7.5, 60 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 2 mM PMSF, 1 mM EDTA; 5% glicerolo, 50 mM NaCl, 1% Triton, 2 µg/mL aprotinina, 2 µg/mL leupeptina. Si procede quindi ad omogenare mediante un potter di vetro/teflon; l'omogenato viene poi trasferito in una microprovetta e centrifugato a 13000 rpm a 4°C per 10 minuti. Il surnatante, che corrisponde al lisato totale (proteine di membrana e citoplasmatiche) viene prelevato facendo attenzione a non toccare il pellet. I pellet contenenti i nuclei vengono risospesi in HCl 0.2 M e incubati over-night a 4°C mantenendoli in leggera agitazione per permettere l'estrazione degli istoni. Il giorno successivo si centrifugano i campioni a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C e si preleva il surnatante che contiene le proteine istoniche. Vengono poi aggiunti 6 volumi di acetone freddo e si prosegue con una incubazione over-night a -20°C per far precipitare degli istoni. I campioni vengono nuovamente centrifugati a 4000 rpm per 10 minuti e i pellet risospesi in un appropriato volume di RIPA buffer composto da: 50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X100, 5 µg/mL aprotinina, 5 µg/mL leupeptina, 2 mM PMSF, 2 mM EDTA.

I campioni ottenuti, sia proteici che istonici, vengono dosati mediante il Micro-BCA assay kit.

#### DOSAGGIO PROTEICO: METODO DEL BCA

Il saggio utilizzato è una formulazione detergente-compatibile basato su un acido bicinconinico (BCA) per la determinazione colorimetrica e la quantificazione delle proteine totali. Questo metodo combina la riduzione del rame ( $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$ ) effettuata dalla proteina in un mezzo alcalino (reazione del biureto) con la determinazione colorimetrica altamente sensibile e selettiva del catione  $\text{Cu}^{1+}$  usando un unico reagente contenente BCA. La reazione colorimetrica è data dalla chelazione

di due molecole di BCA con uno ione rame. Questo complesso idrosolubile esibisce una forte assorbanza a 570nm, che è lineare con l'aumento della concentrazione proteica all'interno di un ampio spettro che va dai 20  $\mu\text{g/ml}$  ai 2000  $\mu\text{g/ml}$ .

In questo saggio è stato preparato un set di proteine standard a concentrazione nota diluendo la confezione stock di BSA standard (Bovine Serum Albumin, 2 mg/ml; Pierce). Le concentrazioni usate per dosare i campioni devono ricadere nel set delle proteine standard scelto opportunamente in relazione alle concentrazioni dei campioni stessi. Nei pozzetti di un'apposita piastra sono stati pipettati le opportune concentrazioni di ogni standard e del campione da dosare. Per il bianco sono stati usati uguali quantità di acqua distillata.

E' stata preparata la soluzione "Working Reagent" miscelando 50 parti di Reagente A (Sodio Carbonato, Sodio Bicarbonato, reagente per la detenzione della BSA e Sodio Tartrato in NaOH 0.2 N) con una parte di reagente B (25 solfato di Rame al 4%). In ogni pozzetto sono stati aggiunti 200  $\mu\text{l}$  della "Working Reagent" e la piastra è stata incubata per 30 minuti a 37 °C. Si è poi misurata l'assorbanza di ogni campione a 570 nm. Mediante analisi di regressione lineare eseguita al computer

(Prism, Graph Pad), si è calcolata l'equazione della retta da cui ricavare le concentrazioni proteiche dei singoli campioni espresse in microgrammi di proteine/microlitro ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) di omogenato tissutale.



## SDS PAGE

La tecnica dell'SDS-PAGE è sicuramente la più utilizzata per analizzare miscele complesse di proteine. In questa metodica le proteine vengono fatte reagire con un detergente anionico, il sodio dodecil solfato (SDS), formando così dei complessi carichi negativamente. La quantità di SDS legato a una proteina e, quindi, la carica totale del complesso è proporzionale alla sua massa molecolare.

Generalmente circa 1.4 g di SDS sono legati da 1 g di proteina, sebbene ci siano delle eccezioni a questa regola. Le proteine vengono denaturate e solubilizzate dal legame con l'SDS, e il complesso assume forma ellissoidale proporzionale al peso molecolare della proteina. Così, proteine al punto isoelettrico (pI), sia acido sia basico, formano complessi carichi negativamente che possono essere separati sulla base delle loro differenze di massa mediante elettroforesi, attraverso un "setaccio" formato da una matrice di gel di poliacrilammide.

Questa è la base dell'SDS, ma il vasto utilizzo di questa tecnica è sostanzialmente dovuto all'eccellente potere di risoluzione, legato all'uso di un sistema discontinuo che impiega due gel a diversa densità, uno "stacking gel" e un "running gel". Questo sistema utilizza il principio della "isotacoforesi", che concentra efficacemente i campioni da volumi ragionevolmente grandi in bande molto piccole, ottenendo, quindi, una migliore separazione delle diverse specie molecolari presenti nella miscela.

Il sistema viene allestito sovrapponendo lo "stacking gel" al "running gel", che è a pH e a concentrazione di poliacrilammide differenti. I campioni vengono introdotti in pozzetti localizzati a livello dello "stacking gel". Quando viene applicato un campo elettrico, gli ioni carichi negativamente migrano verso l'anodo (polo positivo), ma al pH che prevale nello "stacking gel" (pH 6.8) i complessi proteina- SDS hanno mobilità intermedia tra gli ioni cloro (presenti in tutto il sistema) e gli ioni glicinato (presenti nel tampone di corsa). Gli ioni cloro hanno una maggiore mobilità. Gli ioni immediatamente più grandi si concentrano in zone strette nello "stacking gel", ma qui non sono efficacemente separati. Quando i complessi, migrando, raggiungono il "running gel", le loro rispettive mobilità variano in base al diverso pH qui prevalente (pH 8.8) e il fronte formato dagli ioni glicinato raggiunge le bande dei complessi proteina-SDS,

consentendo, in un campo elettrico uniformemente tamponato, la separazione delle proteine in base alla loro massa. Il sistema da noi utilizzato è quello descritto da Laemmly, che impiega i seguenti reagenti:

- 1) soluzione di acrilammide/bisacrilammide in rapporto 37:1.
- 2) miscele all'8%, 10%; 12% o 14% per il running gel: Tris buffer 8.8, 1.5 M (madre), costituito da Trizma Base, SDS e H<sub>2</sub>O d;
- 3) miscela 4.5% per "stacking gel": Tris Buffer 125mM (Madre 0.5M pH 6.8), Acrilamide 4.5% (Madre 40%), Ammonio persolfato 10%, Temed.
- 4) tampone SDS-PAGE 5X: Glicina, 0.96M, Tris base 0.125 M SDS 0.5%.

I due reagenti Temed e ammonio persolfato, aggiunti per ultimi alle miscele, innescano la polimerizzazione della soluzione di poliacrilammide. Lo "stacking gel" è sovrapposto al "running gel" quando quest'ultimo è polimerizzato; inserendo, durante la polimerizzazione, un apposito pettine nello stacking gel che permette di ricavare pozzetti con una capacità di circa 20-25 µl, nei quali vengono caricati sia i campioni, sia opportuni standard di riferimento (markers proteici), costituiti da una miscela di proteine a peso molecolare noto. I campioni sono stati poi fatti correre a una corrente costante di 20 mA/gel.

È stata seminata per ogni pozzetto del gel una quantità di proteine corrispondente a 15 γ per i campioni istonici, 30 γ per gli estratti nucleari, opportunamente preparate in Laemmly buffer 5X (Tris HCl 1M pH 6.8, SDS 10%, Blu di bromofenolo 0.05%, glicerolo 50%, DTT 5%) e successivamente diluite con acqua distillata, al fine di ottenere una concentrazione di Laemmly buffer 1X; prima del caricamento i campioni, così preparati, sono stati bolliti per 3 minuti (10 minuti nel caso delle proteine istoniche), per assicurare la completa denaturazione delle proteine e posti in ghiaccio.

## WESTERN BLOTTING

Il principio della western blotting si basa sulla possibilità di trasferire le proteine, precedentemente separate su gel mediante elettroforesi, su una apposita membrana, utilizzando un apparecchio denominato cella "semi-dry" (Trans-blot, Biorad) e applicando un voltaggio costante per circa 15 minuti. Nel nostro caso sulla superficie dell'apparecchio che rappresenta l'anodo, sono stati posti quattro fogli di carta da filtro Whatmann 3MM, precedentemente imbevuti in tampone di trasferimento (Tris base 25 mM, glicina 150mM, metanolo 10%, pH

8.3), la membrana di PVDF, immersa in tampone di trasferimento per almeno 30 minuti, il gel, altri quattro fogli di carta da filtro Whatmann 3MM, imbevuti nel tampone di trasferimento.

Il sistema è stato poi chiuso ermeticamente, appoggiando su questa pila la superficie dell'apparecchio che rappresenta il catodo: inizia così il trasferimento "semi-dry".

Le nitrocellulose vengono poi incubate per circa due ore in "blocking solution" (latte magro in polvere Regilait 5% sciolto in TBS-Tween 20:Tris Base 20mM, NaCl 150mM, Tween 20 0.1%, pH 7.5), al fine di saturare i siti aspecifici di legame sulle nitrocellulose. Dopo questa incubazione, le membrane di PVDF vengono incubate a 4°C overnight in una soluzione contenente l'anticorpo primario diluito opportunamente in blocking solution. Le membrane vengono successivamente lavate in TBS-Tween 20 con 5 lavaggi di 5 minuti l'uno e una volta in blocking solution per 2 minuti; tali lavaggi sono seguiti da un'ora di incubazione con un anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (Horseradish Peroxidase HRP) e diluito opportunamente in blocking solution. Si procede quindi con altri 5 lavaggi di 5 minuti in TBS-Tween 20 e un ultimo lavaggio di 2 minuti in TBS. I blots sono stati rimossi dall'ultimo lavaggio e processati per lo sviluppo con metodo ECL.

#### SVILUPPO CON METODO ECL

L'ECL è un metodo che permette di visualizzare le proteine immobilizzate su membrana e coniugate, direttamente o indirettamente, con anticorpi legati all'HRP. Tale sistema di rivelazione proteica consiste in una reazione di chemiluminescenza: l'HRP, legato all'anticorpo secondario, ossida un sale peracido, presente nei liquidi per l'ECL, provocando l'ossidazione dell'HRP stessa e catalizzando l'ossidazione del luminolo; questo causa, a sua volta, il passaggio degli elettroni ad uno stato eccitatorio seguito poi da un decadimento allo stato basale, che determina l'emissione di luce ad una lunghezza d'onda di 428 nm. Tale emissione può essere visualizzata con una breve esposizione del blot (i tempi variano a seconda della concentrazione proteica e dell' anticorpo utilizzato), a lastre autoradiografiche specifiche, sensibili alla luce blu. Una volta ottenuta la banda proteica di interesse, è necessario procedere con la sua normalizzazione. Tale tecnica permette di evidenziare se le differenze proteiche ottenute sono

reali o dovute ad errori sperimentali: dopo aver effettuato lo "strip" infatti le nitrocellulose sono incubate con un anticorpo anti- $\beta$ actina: questa proteina è codificata da un "housekeeping gene" che permette di quantificare la concentrazione proteica totale del campione caricato.

#### STRIP

Con questa metodica è possibile rimuovere il legame proteina anticorpo e riutilizzare la stessa membrana con un nuovo anticorpo. La procedura utilizzata è la seguente:

- lavaggio della nitrocellulosa con la soluzione di strip portata a 37°C per 15 minuti;
- 3 lavaggi da 5 minuti ciascuno in TBS Tween;
- Eventuale ripetizione della procedura una seconda volta;
- Incubazione della membrana in blocking solution per circa 2/3 ore e incubazione con anticorpo primario.

#### ANALISI STATISTICA

Viene effettuata mediante software Prism versione 4.0 (Graph Pad software, inc., San Diego, CA, USA). I dati riportati nella presente tesi rappresentano le medie  $\pm$  S.E.M. di almeno 5 animali per gruppo. È stato utilizzato il test t Student con correzione di Welch per comparare due gruppi di dati. La significatività statistica è stata presa quando  $P < 0.05$ .

#### ESTRAZIONE DELL'RNA E QUANTIFICAZIONE

L'RNA totale è stato estratto mediante Trizol Reagent (Invitrogen) e utilizzando materiale RNase free. Il giorno dell'estrazione l'area prescelta viene posta in 1 ml di reagente Trizol e mantenuta in ghiaccio. Si procede quindi ad omogenare mediante un potter di vetro/teflon precedentemente pulito con DEPC per inibire le possibili RNasi presenti; l'omogenato viene trasferito in una microprovetta e incubato per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere al reagente di completare la dissociazione tra RNA e i complessi nucleoproteici. Al campione vengono successivamente aggiunti 200  $\mu$ l di cloroformio e dopo una breve agitazione manuale di circa 15 secondi, il campione viene nuovamente incubato a temperatura ambiente per 3 minuti. Si procede con una centrifuga a 13000 rpm a 4°C per 10 minuti per separare l'RNA dal restante materiale

cellulare (membrane, polisaccaridi e DNA). La fase acquosa contenente l'RNA viene prelevata facendo attenzione a non toccare l'interfase e trasferita in una microprovetta dove il campione viene poi incubato per 10 minuti a temperatura ambiente in presenza di isopropanolo (1 ml) per far precipitare l'RNA. Si prosegue con un'ulteriore centrifuga a 13000 rpm per 30 minuti a 4°C per far depositare sul fondo della provetta l'RNA. Dopo aver rimosso il surnatante, il pellet viene lavato con etanolo al 70% e centrifugato a 9000 rpm per 5 minuti a 4°C. Il surnatante viene nuovamente rimosso e, per far evaporare il restante etanolo, il pellet viene lasciato asciugare 10 minuti. Infine il pellet viene risospeso in un adeguato volume di acqua distillata RNAsi free. L'RNA ottenuto è stato quantificato mediante lettura allo spettrofotometro a UV ad una lunghezza d'onda di 260 nm e la sua qualità controllata mediante corsa su gel di agarosio all'1,5%.

#### PURIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DELL'RNA MESSAGGERO

Per purificare e concentrare il campione di mRNA è stato utilizzato l'RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen). Anche in questo caso tutte le procedure sono eseguite utilizzando materiali RNAsi free, in modo da non degradare o contaminare l'mRNA. Tutti i passaggi sono eseguiti ad una temperatura non inferiore ai 20°C.

Un passaggio preliminare consiste nell'eliminare residui di DNA dall'RNA totale miscelando in una microprovetta una quantità  $\leq 87,5\mu\text{L}$  di RNA totale,  $10\mu\text{L}$  di buffer RDD e  $2,5\mu\text{L}$  di DNAsi e portando ad un volume di  $100\mu\text{L}$  con acqua RNAsi free. La soluzione viene incubata a 20-25°C per 10 minuti.

L'RNeasy MinElute Cleanup kit è costituito da una serie di microcolonne che consentono di ottenere mRNA puro.

Il primo passaggio consiste nell'aggiungere, alla soluzione contenente il campione,  $350\mu\text{L}$  di buffer RLT (non in ghiaccio, in modo da non inibire i componenti) e  $250\mu\text{L}$  di etanolo al 100%. Si trasferiscono  $700\mu\text{L}$  della soluzione contenente il campione al centro di una colonnina RNeasy MinElute, inserita in una provetta da 2mL e si centrifuga per 15 secondi a 15.000 rpm. Il surnatante viene eliminato e la colonnina di purificazione viene trasferita in una nuova provetta da 2 mL; al centro della colonnina si aggiungono  $500\mu\text{L}$  di buffer RPE e si effettua un'altra centrifuga di 15 secondi a 15.000 rpm per lavare la membrana. Il surnatante viene nuovamente eliminato e vengono aggiunti  $500$

$\mu\text{L}$  di etanolo all'80% al centro della colonnina. Si procede centrifugando per 2 minuti a 15.000 rpm. A questo punto si posiziona la colonnina di purificazione in una nuova provetta da 2mL e si lascia aperto il tappo della colonnina, in modo da far evaporare l'etanolo, centrifugando alla massima velocità per 5 minuti. Al termine della centrifuga la colonnina viene trasferita in una eppendorf sterile da 1,5mL; si aggiungono 14  $\mu\text{L}$  di acqua RNAsi free direttamente al centro della colonna e si centrifuga per 1 minuto alla massima velocità per eluire l'RNA. Si ottengono 12  $\mu\text{L}$  di RNA.

Per valutare la purezza del campione, l'RNA ottenuto è stato quantificato mediante lettura allo spettrofotometro a UV ad una lunghezza d'onda di 260 nm.

### RETROTRASCRIZIONE

La Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), o retrotrascrizione da RNA a cDNA, consente di amplificare una molecola di DNA partendo da un insieme di RNA totali che vengono estratti dal campione d'interesse. Per tale motivo, la RT-PCR è una tecnica che viene utilizzata in laboratorio per studiare l'espressione genica. La tecnica prevede lo svolgimento di due fasi: la prima è quella di retrotrascrizione dell'RNA (Reazione First-strand), mentre la seconda è l'amplificazione del cDNA ottenuto nella prima fase (Reazione Second-strand). Per questa procedura si utilizza l'RT2 First Strand Kit (Qiagen)

Il primo filamento di cDNA è stato sintetizzato a partire da 1  $\mu\text{g}$  di RNA a cui sono stati aggiunti 2  $\mu\text{L}$  di buffer GE (5X gDNA Elimination buffer) e acqua RNAsi free per portare ad un volume finale di 10  $\mu\text{L}$ . Si incuba la soluzione a 42°C per 5 minuti e si mette immediatamente in ghiaccio per almeno un minuto.

Successivamente si prepara l'RT cocktail, costituito da:

	1 Reazione
BC3 (5X RT BUFFER 3)	4 $\mu\text{L}$
P2 (Primer and External Control Mix)	1 $\mu\text{L}$
RE3 (RT enzyme Mix 3)	2 $\mu\text{L}$
H2O	3 $\mu\text{L}$
VOLUME FINALE	10 $\mu\text{L}$

Ad ogni campione di aggiungono 10  $\mu$ L di RT Cocktail, si miscela delicatamente con la pipetta e si incuba la soluzione a 42°C per 15 minuti; si blocca poi la reazione scaldando la miscela a 95°C per 5 minuti e si aggiungono 90  $\mu$ L di acqua ad ogni campione. A questo punto si conserva il cDNA ottenuto in ghiaccio per il passaggio successivo, oppure overnight a -20°C.

### Real Time PCR

La tecnica della Real Time-PCR permette la misurazione diretta e la quantificazione della reazione mentre l'amplificazione del cDNA è in atto. La possibilità di seguire le reazioni in tempo reale permette di analizzarle nel momento in cui l'amplificazione è in fase esponenziale. La reazione richiede due inneschi oligonucleotidici, forward e reverse, compatibili con la sequenza di interesse da amplificare, detti primers e un DNA stampo. Sono inoltre necessari l'enzima DNA Polimerasi, i dNTPs e ioni magnesio. L'andamento della sintesi può inoltre essere apprezzato in tempo reale grazie all'impiego della SYBR-Green. Si tratta di una molecola in grado di legare qualsiasi DNA, indipendentemente dalla sequenza: quando si lega al doppio filamento, la SYBR Green incrementa notevolmente la propria fluorescenza, che può quindi essere rilevata. All'inizio della reazione, la sonda si lega a tutto il cDNA presente. Tuttavia, durante la PCR, la DNA polimerasi amplifica esclusivamente la sequenza bersaglio, le cui copie aumentano in modo esponenziale e sono disponibili per il legame della sonda. Di conseguenza, a ogni ciclo si rileva un incremento della fluorescenza proporzionale esclusivamente alla quantità del prodotto specifico della PCR. I geni che codificano per la  $\beta$ -actina e la GAPDH (o gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi) sono stata scelti come normalizzatori dell'analisi, ma solo la GAPDH è stata utilizzata come normalizzatore per le analisi, in quanto è risultato il gene più stabile. Il calcolo accurato della concentrazione di cDNA si ottiene misurando la fluorescenza emessa al ciclo soglia (CT) con l'ausilio dell'algoritmo descritto da Higuchi et al.(1993). Il CT rappresenta il ciclo in cui il segnale di fluorescenza raggiunge un arbitrario ma definito valore soglia nella fase esponenziale precoce della reazione. I CT sono proporzionali al logaritmo del numero di copie iniziali del target.

I campioni sono stati preparati partendo da una miscela di reazione composta nel seguente modo:

<b>Array format</b>	<b>96-well</b>
2X RT2 SYBR Green Mastermix	1350 µl
cDNA synthesis reaction	102 µl
RNase-free water	1248 µl
<b>Volume totale</b>	<b>2700 µl</b>

Ad ogni pozzetto vengono aggiunti 25 µL della miscela.

Il termociclatore, equipaggiato con un rilevatore a fluorescenza che permette l'acquisizione in tempo reale della fluorescenza emessa dal DNA target, viene impostato secondo i seguenti parametri:

Denaturazione iniziale (ciclo 1)	95°C – 10 minuti
40 cicli: Annealing, estensione e lettura fluorescenza	95°C – 15 secondi
Hold	60°C – 1 minuto

Al fine di valutare specifici messaggeri correlati al sistema endocannabinoide e geni coinvolti nella plasticità sinaptica, abbiamo usato un Array (RT2 Profiler PCR Array - Qiagen) costituito da 96 pozzetti. La piastra è stata progettata in modo da poter confrontare due campioni alla volta (controllo vs. trattato) e contiene per ciascun campione 5 geni coinvolti nel sistema endocannabinoide, o strettamente correlati ad esso, (Cnr1, Mgl1, Faah, Ppara, Pparg), 35 geni coinvolti nella plasticità sinaptica, due geni house-keeping (Gapdh,  $\beta$ act), un controllo per la contaminazione di DNA genomico (RGDC), che in modo specifico rileva contaminazioni da DNA genomico, 3 controlli per la retrotrascrizione (RTC), che testano l'efficienza della reazione di trascrizione, e 3 controlli positivi (PPC) come riportato nella figura sottostante.



## RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array: CAPR11541

### Custom RT<sup>2</sup>Profiler™ PCR Array

#### Array Layout

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Bdnf	Grin2a	Gabra1	Camk2a	Homer1	Gapdh	Bdnf	Grin2a	Gabra1	Camk2a	Homer1	Gapdh
<b>B</b>	Cnr1	Grin2b	Gabra2	Camk2g	Pick1	RGDC	Cnr1	Grin2b	Gabra2	Camk2g	Pick1	RGDC
<b>C</b>	Dlg4	Grm1	Gabrb1	Pdyn	Synpo	RTC	Dlg4	Grm1	Gabrb1	Pdyn	Synpo	RTC
<b>D</b>	Faah	Grm2	Htr2a	Gad1	Crebbp	RTC	Faah	Grm2	Htr2a	Gad1	Crebbp	RTC
<b>E</b>	Mgll	Grm3	Sirt1	Abat	Arc	RTC	Mgll	Grm3	Sirt1	Abat	Arc	RTC
<b>F</b>	Gria1	Grm5	Ppara	Prkaca	Reln	PPC	Gria1	Grm5	Ppara	Prkaca	Reln	PPC
<b>G</b>	Gria2	Gabbr1	Pparg	Nos1	Adcy1	PPC	Gria2	Gabbr1	Pparg	Nos1	Adcy1	PPC
<b>H</b>	Grin1	Gabbr2	Ntrk2	Creb1	Actb	PPC	Grin1	Gabbr2	Ntrk2	Creb1	Actb	PPC

#### Gene Table

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description
A01, A07	Rn.11266	NM_012513	Bdnf	Brain-derived neurotrophic factor
B01, B07	Rn.89774	NM_012784	Cnr1	Cannabinoid receptor 1 (brain)
C01, C07	Rn.9765	NM_019621	Dlg4	Discs, large homolog 4 (Drosophila)
D01, D07	Rn.89119	NM_024132	Faah	Fatty acid amide hydrolase
E01, E07	Rn.40396	NM_138502	Mgll	Monoglyceride lipase
F01, F07	Rn.29971	NM_031608	Gria1	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 1
G01, G07	Rn.91361	NM_017261	Gria2	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2
H01, H07	Rn.9840	NM_017010	Grin1	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1
A02, A08	Rn.9710	NM_012573	Grin2a	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2A
B02, B08	Rn.9711	NM_012574	Grin2b	Glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 2B
C02, C08	Rn.87787	NM_017011	Grm1	Glutamate receptor, metabotropic 1
D02, D08	Rn.9681	NM_001105711	Grm2	Glutamate receptor, metabotropic 2
E02, E08	Rn.41715	NM_001105712	Grm3	Glutamate receptor, metabotropic 3
F02, F08	Rn.29972	NM_017012	Grm5	Glutamate receptor, metabotropic 5
G02, G08	Rn.30059	NM_031028	Gabbr1	Gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1
H02, H08	Rn.162814	NM_031802	Gabbr2	Gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 2
A03, A09	Rn.28463	NM_183326	Gabra1	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 1
B03, B09	Rn.48180	NM_001135779	Gabra2	Gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, subunit alpha 2
C03, C09	Rn.207157	NM_012956	Gabrb1	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 1
D03, D09	Rn.10294	NM_017254	Htr2a	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2A
E03, E09	Rn.219976	NM_001107627	Sirt1	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)
F03, F09	Rn.9753	NM_013196	Ppara	Peroxisome proliferator activated receptor alpha
G03, G09	Rn.23443	NM_013124	Pparg	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
H03, H09	Rn.11246	NM_012731	Ntrk2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
A04, A10	Rn.107499	NM_012920	Camk2a	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
B04, B10	Rn.10961	NM_133605	Camk2g	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma
C04, C10	Rn.44471	NM_019374	Pdyn	Prodynorphin
D04, D10	Rn.91245	NM_017007	Gad1	Glutamate decarboxylase 1
E04, E10	Rn.10090	NM_031003	Abat	4-aminobutyrate aminotransferase
F04, F10	Rn.20	NM_001100922	Prkaca	Protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha
G04, G10	Rn.10573	NM_052799	Nos1	Nitric oxide synthase 1, neuronal
H04, H10	Rn.90061	NM_031017	Creb1	CAMP responsive element binding protein 1
A05, A11	Rn.37500	NM_031707	Homer1	Homer homolog 1 (Drosophila)
B05, B11	Rn.24750	NM_053460	Pick1	Protein interacting with PRKCA 1

Position	UniGene	GenBank	Symbol	Description
C05, C11	Rn.42910	NM_021695	Synpo	Synaptopodin
D05, D11	Rn.108128	NM_133381	Crebbp	CREB binding protein
E05, E11	Rn.10086	NM_019361	Arc	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein
F05, F11	Rn.98353	NM_080394	Reln	Reelin
G05, G11	Rn.214145	NM_001107239	Adcy1	Adenylate cyclase 1 (brain)
H05, H11	Rn.94978	NM_031144	Actb	Actin, beta
A06, A12	Rn.91450	NM_017008	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
B06, B12	N/A	U26919	RGDC	Rat Genomic DNA Contamination
C06, C12	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
D06, D12	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
E06, E12	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
F06, F12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
G06, G12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H06, H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

## ANALISI STATISTICA

Viene effettuata mediante software Prism versione 4.0 (Graph Pad software, inc., San Diego, CA, USA). I dati riportati nella presente tesi rappresentano le medie  $\pm$  S.E.M. di almeno 4 animali per gruppo. È stato utilizzato il test t di Student per comparare i due gruppi sperimentali. La significatività statistica è stata presa quando  $P < 0.05$ .

## TEST COMPORTAMENTALI

Tutti i test comportamentali sono stati condotti in una stanza (3m x 4m), illuminata da una luce al neon (circa 30 lux) e priva di riferimenti visivi che possano influenzare il comportamento degli animali. Il giorno del test gli animali sono stati portati nella stanza 30 minuti prima dello svolgimento dell'esperimento in modo da favorirne l'ambientamento.

## TEST DEL RICONOSCIMENTO DEL NUOVO OGGETTO (NOR)

Il test del Novel Object Recognition è basato sulla naturale e spontanea tendenza degli animali a esplorare la novità e quindi ad interagire maggiormente con un oggetto nuovo piuttosto che con uno familiare. Sfruttando questa caratteristica è possibile andare a valutare la memoria di riconoscimento, ovvero l'abilità di riconoscere come familiare un oggetto con cui l'animale è venuto a contatto in precedenza rispetto ad un oggetto nuovo che gli viene presentato durante il test.

## APPARECCHIATURA

L'apparecchiatura che è stata utilizzata consiste in un'arena in plexiglass delle dimensioni di 60 cm di lunghezza, 60 cm di larghezza e 60 cm di altezza (Ugo Basile, Varese, Italia) e priva di coperchio.

I movimenti degli animali sono stati monitorati per mezzo di cronometri digitali.

## PROCEDURA

Tutti gli animali sono stati sottoposti a un singolo test suddiviso in due fasi: familiarizzazione (fase 1) e test (fase 2).

Nella prima fase all'interno dell'arena sono stati posti due oggetti identici per forma, colore e dimensioni; il ratto è stato quindi posizionato nell'arena e lasciato

libero di esplorare i due oggetti per 5 minuti. Al termine di questa fase ogni animale è stato rimosso dall'arena e riposto nella propria gabbia per un periodo di tempo di 2 minuti (tempo di ritenzione).

Trascorso questo intervallo, l'animale è stato sottoposto alla fase di test in cui uno dei due oggetti, divenuti familiari nella fase 1, è stato sostituito con un oggetto nuovo, diverso dal precedente per forma, colore e dimensione. In questa fase gli animali sono stati lasciati liberi di esplorare i nuovi oggetti per 3 minuti.

E' considerata esplorazione solo l'interazione diretta e volontaria dell'animale con l'oggetto; il comportamento degli animali è stato monitorato per mezzo di due cronometri ed è stato quindi calcolato il tempo totale di esplorazione (in secondi) dei due oggetti familiari nella prima fase e il tempo totale di esplorazione dei due oggetti (familiare e nuovo) nella seconda.

L'indice di discriminazione (ID) rappresenta la differenza nel tempo di esplorazione tra l'oggetto nuovo (EN) e quello familiare (EF) sul tempo di esplorazione di entrambi gli oggetti durante la fase di test ed è calcolato mediante la seguente formula

$$ID = [(EN - EF)/(EN + EF)] \times 100$$

Il riconoscimento dell'oggetto in queste misurazioni è dato dal maggior tempo speso dall'animale ad esplorare il nuovo oggetto piuttosto che quello familiare. Dopo ogni singola fase e ogni test, l'arena e gli oggetti utilizzati sono stati accuratamente puliti con acido acetico 0.1% in modo da rimuovere ogni traccia dell'animale.

#### TEST DEL NUOVO FORZATO (FST)

Il test del nuoto forzato (Forced Swim Test) si basa sul principio che l'animale, quando posto in una situazione che non offre vie d'uscita, sviluppa una postura di immobilità, nota come "passive coping behavior". Questo test è stato condotto per valutare gli effetti a lungo termine dell'esposizione adolescenziale al THC sullo sviluppo di sintomi simil-ansiosi.

## APPARECCHIATURA

L'apparecchiatura utilizzata consiste di un cilindro di plexiglass trasparente alto 50 cm e con un diametro di 20 cm che viene riempito fino a 30 cm di altezza con acqua alla temperatura di circa 25 °C.

I movimenti compiuti dall'animale durante la fase di test sono stati monitorati per mezzo di cronometri.

## PROCEDURA

Il test è stato condotto utilizzando una variante rispetto al protocollo di Porsolt e collaboratori (1978) dal momento che è stato articolato in una sola giornata, i ratti sono stati posti nel cilindro e il loro comportamento è stato monitorato per un'unica sessione della durata di 15 minuti.

Inizialmente gli animali cercano disperatamente di uscire dall'acqua ma successivamente, rendendosi conto che da questa situazione non è possibile sfuggire, assumono una postura di immobilità che consente loro di eseguire solo i movimenti minimi per tenere la testa fuori dall'acqua.

Il principale parametro comportamentale valutato è l'immobilità ma sono stati anche misurati i tempi di climbing (movimenti attivi che l'animale compie per cercare di uscire dal cilindro) e di nuoto (l'animale nuota immergendosi o attraversando il centro del cilindro).

Dopo 15 minuti di nuoto forzato, i ratti sono stati tolti dal cilindro e asciugati prima di riporli nella loro gabbia.

Il cilindro è stato lavato e riempito con acqua pulita dopo aver testato ogni animale.

## TEST DELL'INTERAZIONE SOCIALE (SI)

Il test dell'interazione sociale si basa sul principio che i ratti, essendo animali socievoli, amano giocare tra loro e stare in compagnia ma in alcune situazioni, se il partner è sconosciuto, possono assumere un comportamento aggressivo. La misura dell'interazione sociale è rappresentata dal tempo che coppie di ratti sconosciuti spendono per esplorarsi.

Questo test viene utilizzato per valutare la presenza di eventi aggressivi e comportamenti sociali.

## APPARECCHIATURA

L'apparecchiatura che è stata utilizzata consiste in un'arena in plexiglass delle dimensioni di 60 cm di lunghezza, 60 cm di larghezza e 60 cm di altezza (Ugo Basile, Varese, Italia) e priva di coperchio.

I movimenti degli animali sono stati monitorati per mezzo di cronometri digitali.

## PROCEDURA

Il giorno del test tutti i ratti sono stati sottoposti ad un periodo di ambientamento, nel quale sono posti da soli nell'arena in modo da familiarizzare con l'ambiente nel quale viene condotto il test.

Nella fase di test vero e proprio una coppia di animali, formata da ratti sconosciuti l'uno all'altro e di peso simile, è stata posizionata delicatamente all'interno dell'arena familiare e scarsamente illuminata. Gli animali sono stati posti agli angoli opposti dell'arena.

Il test è costituito da un'unica sessione della durata di 10 minuti durante la quale gli animali sono lasciati liberi di interagire tra loro. E' stato quindi cronometrato il tempo speso in comportamenti sociali (inseguimenti, annusamenti, scavalcamenti) ed è stato misurato il numero di comportamenti aggressivi (morsi, lotte).

Al termine di ogni fase di test l'arena è stata accuratamente pulita con acido acetico 0.1%

## ANALISI STATISTICA

Viene effettuata mediante software Prism versione 4.0 (Graph Pad software, inc., San Diego, CA, USA). I dati riportati nella presente tesi rappresentano le medie  $\pm$  S.E.M. di almeno 5 animali per gruppo. Il test statistico utilizzato per il confronto dei quattro gruppi è l'ANOVA a due vie seguita dal Bonferroni post hoc test.

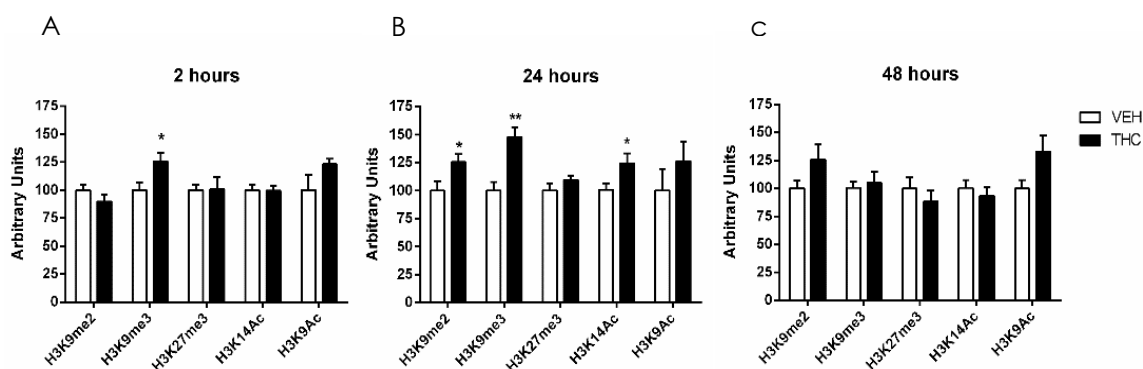
*RISULTATI*

## RISULTATI

### VALUTAZIONE DELLE MODIFICAZIONI ISTONICHE

Il primo obiettivo della seguente tesi è stato quello di valutare l'effetto del trattamento cronico con THC in ratti femmine adolescenti (35-45 PND) sui livelli di metilazione ed acetilazione di alcuni residui di lisina dell'istone H3. In particolare abbiamo studiato i livelli di dimetilazione e trimetilazione della lisina 9 (H3K9me2, H3K9me3), marker associati a repressione trascrizionale, ed i livelli di acetilazione della lisina 9 e 14 (H3K9ac e H3K14ac) marker associati ad attivazione trascrizionale. Queste analisi sono state condotte 2, 24 e 48 ore dalla fine del trattamento nella PFC.

#### ADOLESCENTI



**Figura 1:** effetto del trattamento cronico con dosi crescenti di THC (2.5 mg/Kg dal 1-3 giorno; 5 mg/kg dal 4-7 giorno; 10 mg/Kg dal 8-11 giorno) in ratti femmine adolescenti (35-45 PND) sulle modificazioni istoniche, a diverse tempistiche dall'ultima somministrazione: A) 2h post-trattamento; B) 24h post-trattamento; C) 48h post-trattamento. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di almeno 5 animali per gruppo. \*  $p < 0.05$  verso il veicolo (Student's *t*-test).

Già a due ore dalla fine del trattamento cronico (fig. 1A), il THC induce un incremento significativo (25%) dei livelli di H3K9me3. Non si osservano invece alterazioni nè dei livelli di H3K9me2 e H3K27me3 nè dei livelli di H3K9ac e H3K14ac.

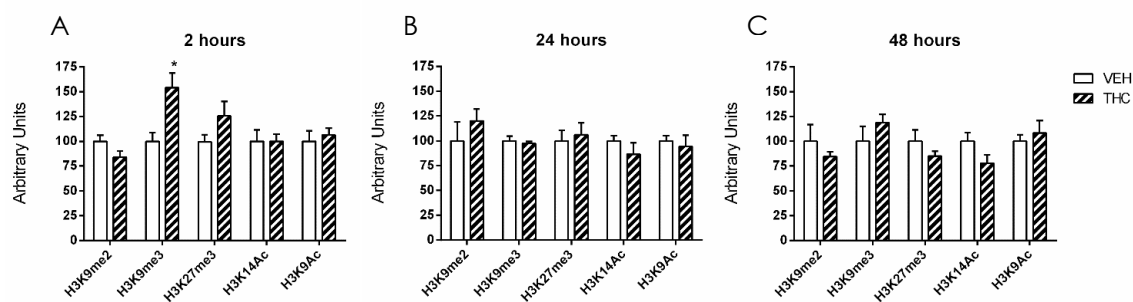
Ventiquattro ore dopo l'ultima somministrazione di THC (fig. 1B) è ancora presente e aumenta d'intensità l'incremento significativo dei livelli di H3K9me3 (48%). È inoltre possibile osservare un aumento significativo sia dei livelli di H3K9me2 (25%) che dei livelli di H3K14ac (26%). Per quanto riguarda la H3K27me3

e l'H3K9ac, il trattamento cronico con THC in adolescenza non induce alterazioni significative a questo intervallo di tempo.

Ventiquattro ore più tardi, cioè 48 ore dopo la fine del trattamento cronico con THC (figura 1C), tutte le modificazioni istoniche alterate a 24 ore si riportano a controllo, anche se è possibile osservare un incremento di H3K9ac (33%), che tuttavia non raggiunge la significatività statistica.

## ADULTI

A scopo comparativo, lo stesso tipo di analisi è stato condotto in animali adulti trattati cronicamente con THC. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza un quadro di modificazioni alquanto differente (fig. 2).



**Figura 2:** effetto del trattamento cronico con dosi crescenti di THC (2.5 mg/Kg dal 1-3 giorno; 5 mg/kg dal 4-7 giorno; 10 mg/Kg dal 8-11 giorno) in ratti femmine adulti (75-85 PND) sulle modificazioni istoniche, a diverse tempistiche dall'ultima somministrazione: A) 2h post-trattamento; B) 24h post-trattamento; C) 48h post-trattamento. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di almeno 5 animali per gruppo. \*  $p < 0.05$  verso il veicolo (Student's t-test).

A 2 ore dalla fine del trattamento (fig. 2A) negli animali esposti al THC si osserva un incremento significativo dei livelli di H3K9me3 (25%), simile a quello presente negli animali trattati durante il periodo adolescenziale; si può inoltre osservare un leggero incremento dei livelli di H3K27me3 che però non risulta statisticamente significativo. Per quanto riguarda la H3K9me2, H3K9ac e H3K14ac, il trattamento cronico con THC in età adulta non induce alcuna alterazione significativa.

Al contrario di quanto osservato negli animali adolescenti, a 24 e 48 ore dall'ultima somministrazione (fig. 2B e 2C), l'esposizione cronica al THC negli



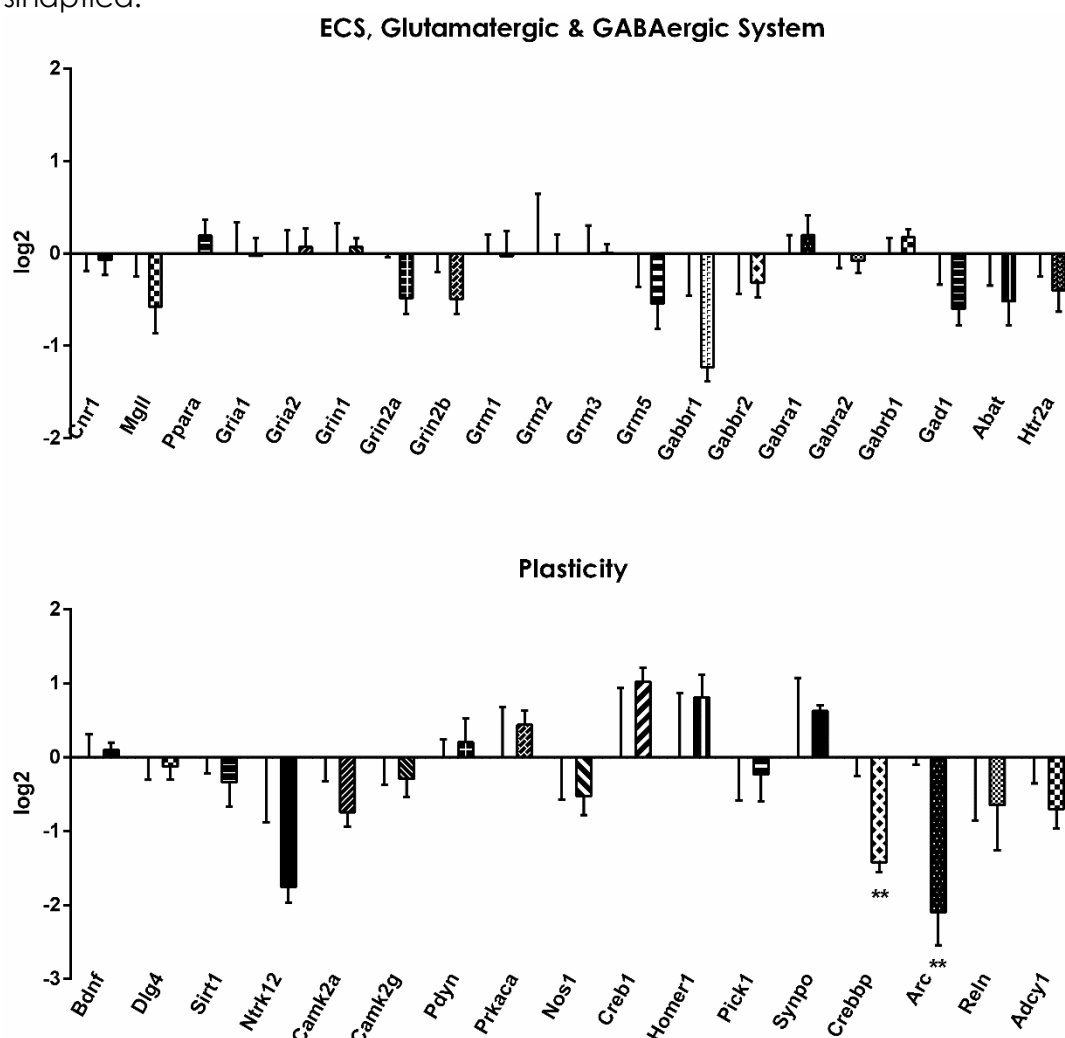
animali adulti non induce alterazioni significative in nessuna delle modificazioni istoniche studiate.

Questi dati, se paragonati a quelli ottenuti negli animali adolescenti, suggeriscono che il trattamento cronico con THC, indipendentemente dalla finestra temporale di esposizione, induce a livello della corteccia prefrontale un incremento significativo dei livelli di H3K9me3, 2 ore dopo l'ultima iniezione di THC. Tuttavia, mentre negli animali adolescenti le alterazioni si intensificano e persistono fino a 24 ore dalla sospensione del trattamento, negli animali adulti vengono riportate subito a controllo, suggerendo quindi che l'adolescenza potrebbe rappresentare una finestra temporale particolarmente vulnerabile agli effetti avversi del THC.

## STUDIO DEL PROFILO GENICO

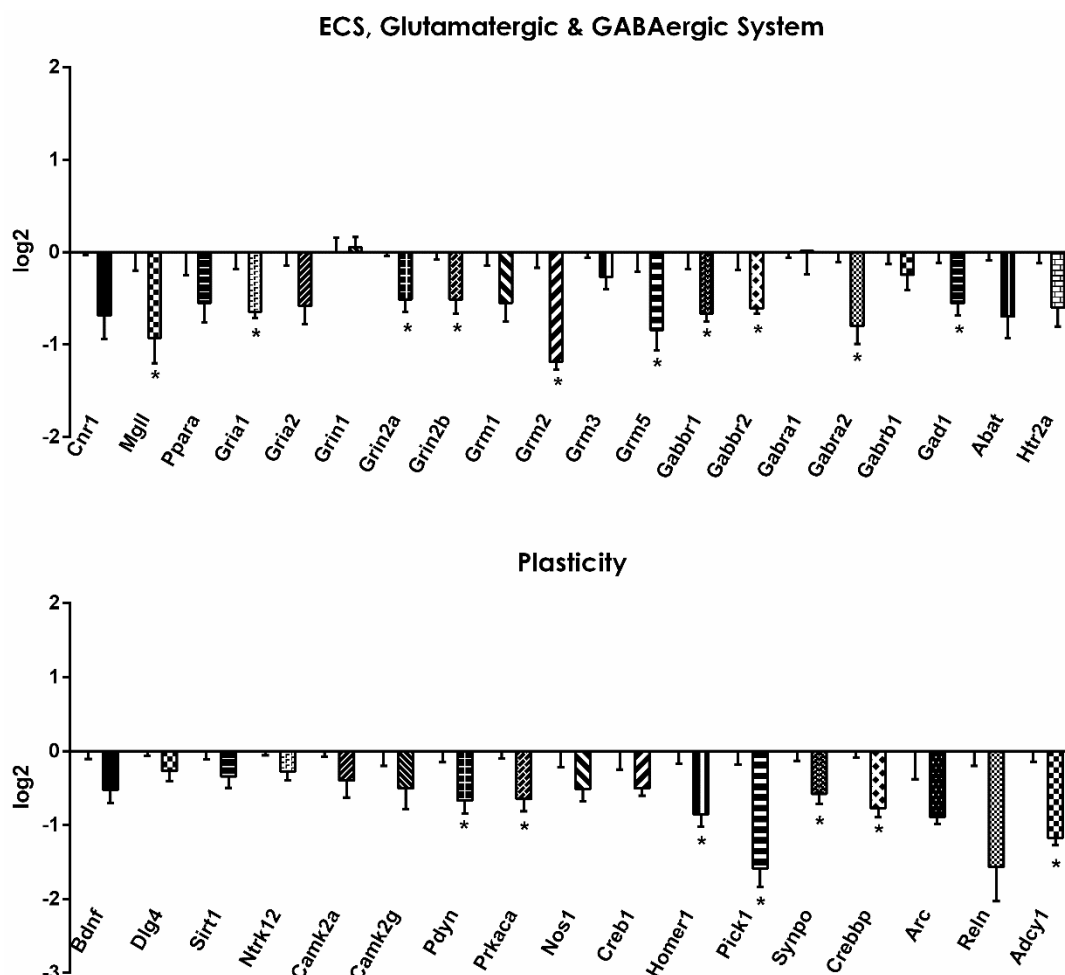
### ADOLESCENTI

Poichè è noto che le modificazioni istoniche si ripercuotono sui processi di trascrizione genica, il passo successivo del presente progetto di tesi è stato quello di valutare se il trattamento cronico con THC in adolescenza fosse in grado di alterare l'espressione genica. Poichè il cervello adolescente è caratterizzato dalla presenza di intensi processi di rimodellamento sinaptico in cui il sistema endocannabinoide sembra giocare un ruolo fondamentale, abbiamo scelto di indagare i livelli di messaggero di geni appartenenti al sistema endocannabinoide e di geni strettamente coinvolti nei processi di plasticità sinaptica.



**Figura 3:** Effetti del trattamento cronico con dosi crescenti di THC in ratti femmine adolescenti (35-45 PND) sui livelli di espressione di geni del sistema endocannabinoide e strettamente coinvolti nei processi di plasticità sinaptica a livello della corteccia prefrontale prelevata da ratti adolescenti 2 ore dopo l'ultima somministrazione di THC. Espressione valutata attraverso RT-PCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di 4 animali per gruppo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  verso veicolo; (Student's t-test, correzione di welch).

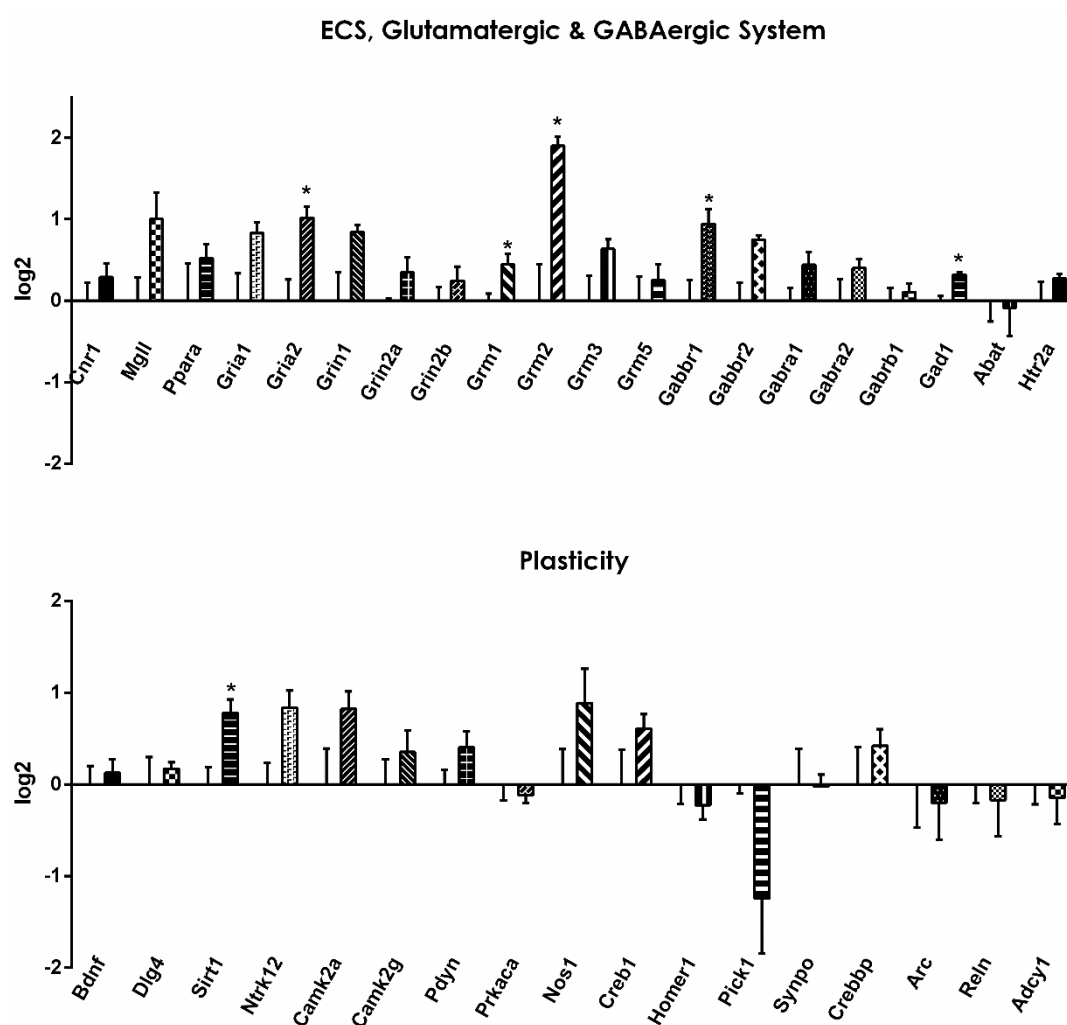
In figura 3 sono mostrati i risultati ottenuti dagli studi condotti sui livelli di mRNA nella corteccia prefrontale di ratti adolescenti, 2 ore dopo l'ultima somministrazione di THC. Nonostante si osserva una tendenza generalizzata alla downregolazione, l'analisi statistica evidenzia la presenza di una riduzione significativa solo della trascrizione del gene *Crebbp*, che codifica per la *Creb Binding Protein*, e dell' Early gene *Arc*.



**Figura 4:** Effetti del trattamento cronico con dosi crescenti di THC in ratti femmine adolescenti (35-45 PND) sui livelli di espressione di geni del sistema endocannabinoide e strettamente coinvolti nei processi di plasticità sinaptica a livello della corteccia prefrontale prelevata da ratti adolescenti 24 ore dopo l'ultima somministrazione di THC. Espressione valutata attraverso RT-PCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di 4 animali per gruppo. \* $p < 0.05$  verso veicolo (Student's *t*-test, correzione di welch).

Ventiquattro ore dopo l'ultima somministrazione di THC (fig. 4), l'analisi dei dati mostra una downregolazione della trascrizione statisticamente significativa per molti dei geni analizzati. Infatti, i trascritti di ben 17 geni su 37 risultano essere downregolati rispetto agli animali controllo. Più precisamente risultano essere significativamente downregolati ( $p < 0.05$ ) il gene *Mgl1* appartenente al sistema

endocannabinoide e diversi geni coinvolti nei processi di plasticità sinaptica, tra cui geni che codificano per i recettori glutamatergici come *Gria1* (che codificano per la subunità A1 del recettore AMPA), *Grin2a* e *Grin2b* (che codificano per le subunità dei recettori NMDA), *Grm 2* e *5* (che codificano per i recettori metabotropici del glutammato); GABAergici come *Gabbr1*, *Gabbr2* e *Gabra2* (che codifica per le subunità dei recettori per il GABA) e *Gad1* (che codifica per la glutammato decarbossilasi cerebrale, enzima che sintetizza il GABA) e geni che codificano per proteine direttamente coinvolte nei processi e nelle pathway di rimodellamento sinaptico (*Pdyn*, *Prkaca*, *Homer1*, *Pick1*, *Synpo*, *Crebbp* e *Adcy1*).



**Figura 5:** Effetti del trattamento cronico con dosi crescenti di THC in ratti femmine adolescenti (35-45 PND) sui livelli di espressione di geni del sistema endocannabinoide e strettamente coinvolti nei processi di plasticità sinaptica a livello della corteccia prefrontale prelevata da ratti adolescenti 48 ore dopo l'ultima somministrazione di THC. Espressione valutata attraverso RT-PCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di 4 animali per gruppo. \* $p < 0.05$  verso veicolo (Student's t-test, correzione di welch).

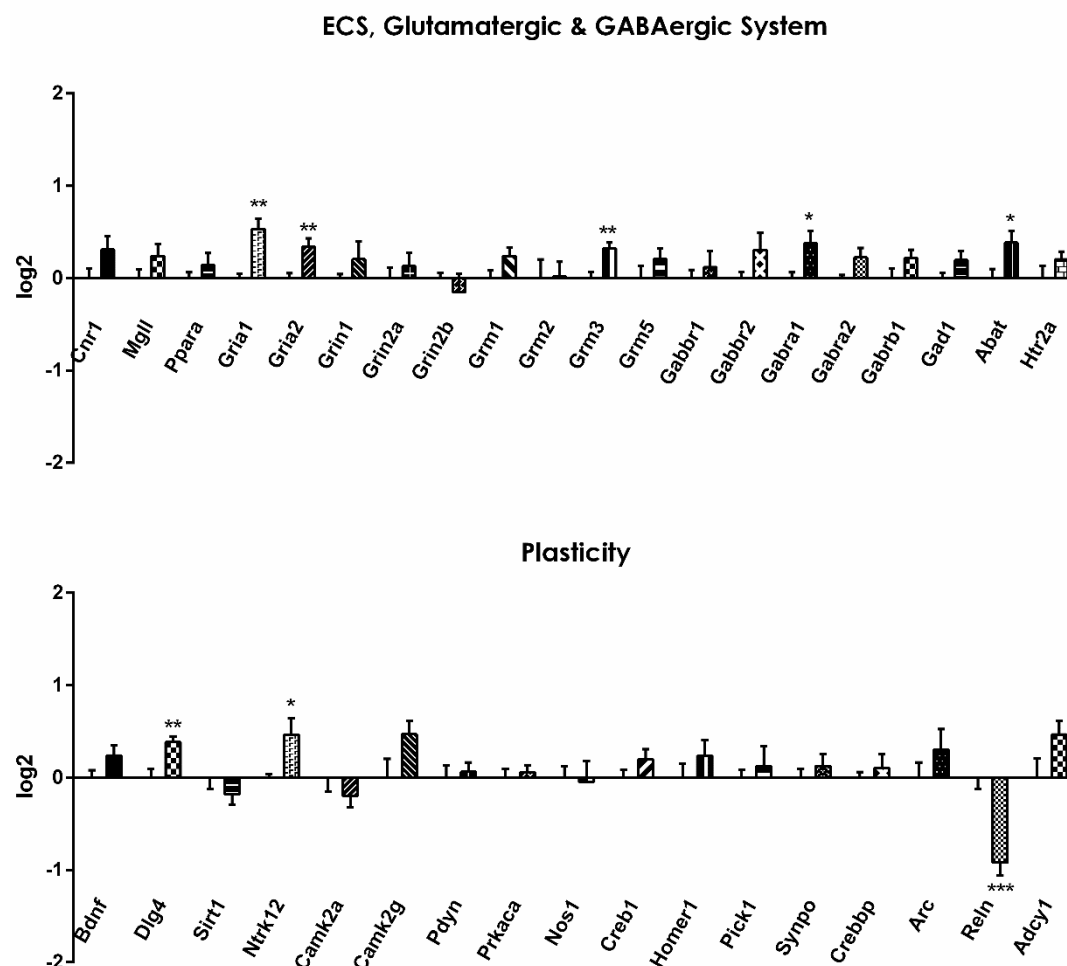
Quarantotto ore dopo l'ultima somministrazione di THC (fig. 5), al contrario di quanto osservato nelle tempistiche precedenti, l'analisi dei dati mostra un'up-regolazione statisticamente significativa dei messaggeri relativi a *Gria2*, *Gabbr1*, *Gad1*, *Sirt1*.

Inoltre, tutti gli RNA messaggeri dei geni che mostravano una riduzione significativa di espressione a 24 ore, raggiungono livelli di espressione simile a quelli degli animali veicolo.

Complessivamente, i dati ottenuti indicano che l'esposizione adolescenziale al THC induce un generale effetto di repressione dei geni coinvolti nei processi di rimodellamento sinaptico. Questo effetto inizia a manifestarsi, seppur lievemente, già a due ore dalla sospensione del trattamento, ma diventa molto più profondo e diffuso a 24 ore dall'ultima iniezione di THC. A 48 ore, invece, questo profondo effetto di down-regolazione viene recuperato e per alcuni trascritti si osserva addirittura la presenza di una significativa up-regolazione.

## ADOLESCENTI (PND 75)

Per valutare la persistenza delle alterazioni osservate, abbiamo condotto lo studio del profilo genico al PND 75, quando gli animali raggiungono l'età adulta e si sviluppa il fenotipo simil depressivo-psicotico indotto dal trattamento adolescenziale con THC.



**Figura 6:** Effetti del trattamento cronico con dosi crescenti di THC in ratti femmine adolescenti (35-45 PND) sui livelli di espressione di geni del sistema endocannabinoide e strettamente coinvolti nei processi di plasticità sinaptica a livello della corteccia prefrontale prelevata a 75 PND. Espressione valutata attraverso RT-PCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di 7 animali per gruppo. \* $p < 0.05$  verso veicolo (Student's t-test, correzione di welch).

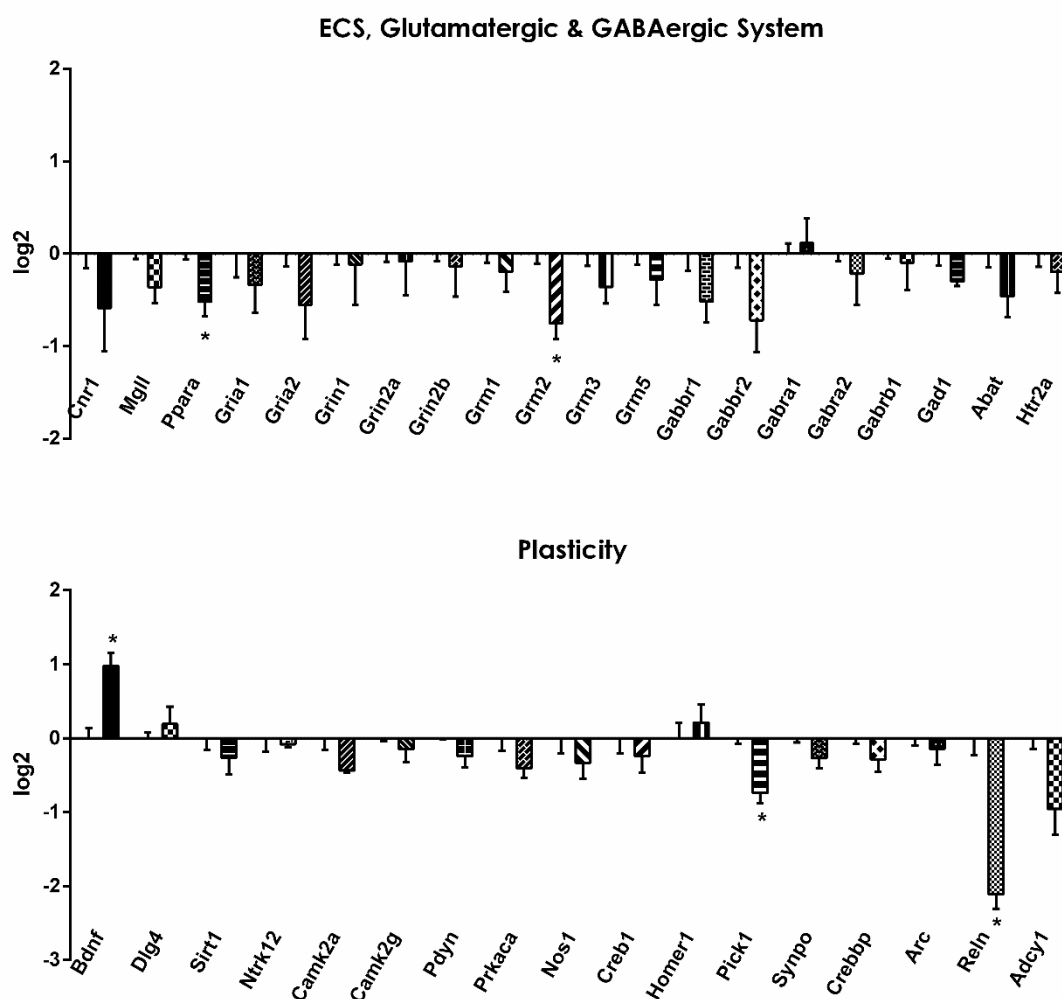
In figura 6 sono riportati i risultati relativi agli studi condotti sui livelli di mRNA nella corteccia prefrontale di ratti adolescenti a 30 giorni (75 PND) dall'ultima somministrazione di THC. In questo caso, l'analisi statistica indica che ben 8 geni risultano essere significativamente alterati: i messaggeri di Gria1, Gria2, Grm3, Gabra1, Abat, Dlg4 e Ntrk12 sono significativamente incrementati, mentre solo il

messaggero del gene *Reln*, che codifica per la Relina, risulta essere fortemente down-regolato ( $p < 0.001$ ).

Complessivamente questi dati indicano che i livelli di RNA messaggero dei geni analizzati continuano a modularsi, probabilmente per controbilanciare lo squilibrio indotto dal trattamento con THC, fino a portarsi a livello dei controlli al raggiungimento dell'età adulta dove, però, permangono alcune alterazioni che riguardano principalmente il sistema glutamatergico e la Relina.

## ADULTI

Dato che a 24 dalla fine del trattamento cronico con THC abbiamo osservato le maggiori differenze a livello istonico tra l'esposizione adolescenziale e quella adulta, abbiamo voluto verificare l'esistenza di una diversa suscettibilità al THC anche a livello trascrizionale. Quindi, lo studio del profilo genico è stato condotto anche in ratti femmine adulte trattate con THC, a 24 ore dall'ultima iniezione.



**Figura 7:** Effetti del trattamento cronico con dosi crescenti di THC in ratti femmine adulti (75-85 PND) sui livelli di espressione di geni del sistema endocannabinoide e strettamente coinvolti nei processi di plasticità sinaptica a livello della corteccia prefrontale prelevata da ratti adolescenti 24 ore dopo l'ultima somministrazione di THC. Espressione valutata attraverso RT-PCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di 4 animali per gruppo. \* $p < 0.05$  verso veicolo (Student's *t*-test, correzione di welch).

L'analisi statistica mostra un profilo di espressione profondamente diverso da quello ottenuto negli animali adolescenti (fig. 7), infatti risultano essere

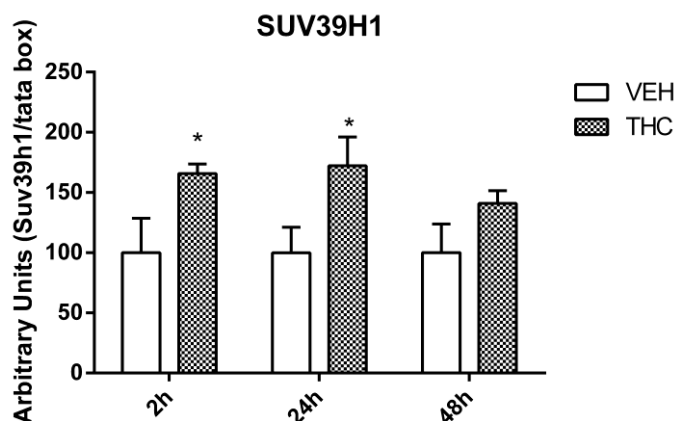


significativamente ridotti solo i geni *Ppara*, *Grm2*, *Pick1* e *Reln*, mentre l'mRNA di *BDNF* risulta essere significativamente aumentato.

Il quadro che emerge dalla comparazione dei profili di espressione genica ottenuti negli animali adulti e adolescenti supporta l'ipotesi di un differente impatto del trattamento cronico con THC nei due gruppi di animali. Appare chiaro che il cervello adolescente subisce molte più modifiche sia a carico dei messaggeri del sistema endocannabinoide sia di quelli coinvolti nella plasticità sinaptica rispetto al cervello adulto, confermando ancora una volta la maggior vulnerabilità del cervello adolescente agli effetti del THC.

### ANALISI DEI LIVELLI PROTEICI DI SUV39H1

I risultati fin qui ottenuti indicano che il principale evento epigenetico indotto dal trattamento cronico con THC è l'incremento dei livelli di H3K9me3. Dati presenti in letteratura dimostrano che il principale enzima responsabile del trasferimento del terzo gruppo metilico sul residuo di lisina 9 dell'istone H3 è la iston-lisina metiltransferasi SUV39H1. Abbiamo quindi deciso di valutare se l'esposizione adolescenziale al THC fosse in grado di alterare i livelli di tale enzima.



**Figura 8:** Effetti del trattamento cronico con dosi crescenti di THC in ratti femmine adolescenti (35-45 PND) sui livelli di espressione di *Suv39h1* a livello della corteccia prefrontale prelevata da ratti adolescenti a 2, 24 e 48 ore dopo l'ultima somministrazione di THC. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di almeno 5 animali per gruppo. \*  $p < 0.05$  verso il veicolo (Student's *t*-test).

Il trattamento cronico con THC in adolescenza induce, a livello della corteccia prefrontale, un incremento significativo dei livelli di SUV39H1 a 2 ore dall'ultima somministrazione. Tale incremento significativo è osservabile anche a 24 ore dalla sospensione del trattamento, mentre a 48 ore i livelli di SUV39H1 si riportano a controllo (fig. 8).

L'incremento nei livelli di SUV39H1 osservato a 2 e 24 ore dall'ultima iniezione di THC, ben si correla con l'incremento di H3K9me3 osservato nei medesimi intervalli di tempo, nella corteccia prefrontale degli animali esposti al THC durante il periodo adolescenziale.

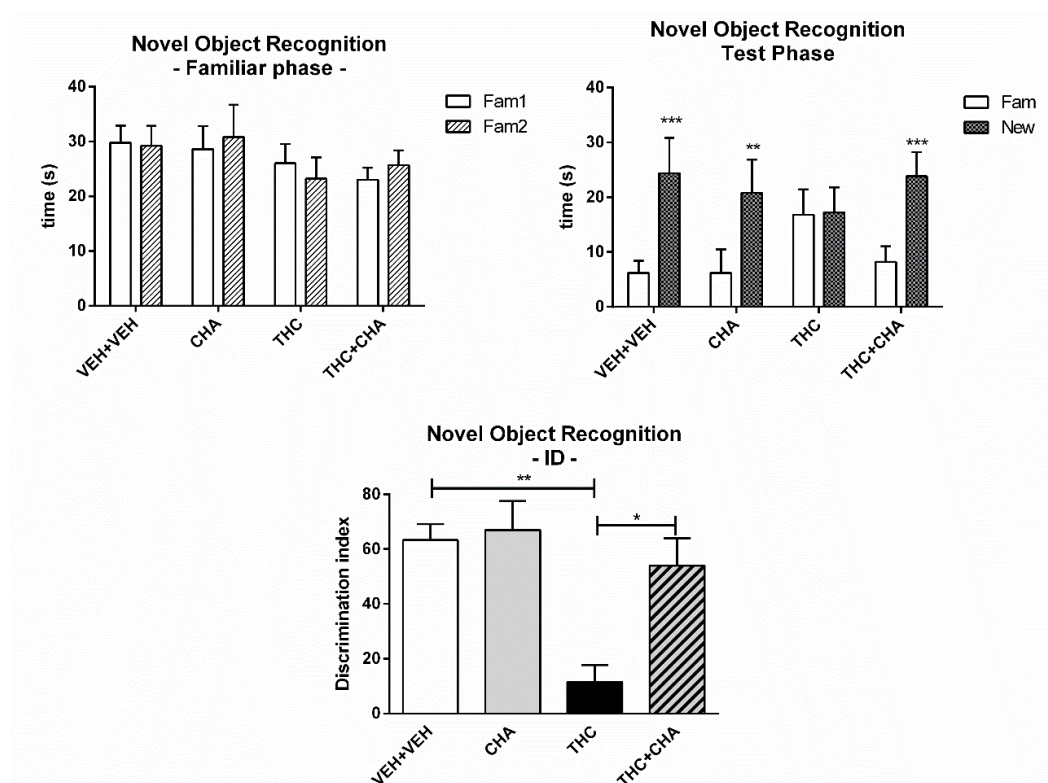
In conclusione i dati fin qui riportati, ci permettono di affermare che l'esposizione cronica al THC induce modificazioni istoniche che risultano maggiori nel numero e nell'intensità quando il trattamento viene condotto durante il periodo adolescenziale. Inoltre, i risultati ottenuti sembrano indicare che il principale

effetto epigenetico indotto dall'esposizione adolescenziale al THC è l'incremento della trimetilazione della lisina 9 sull'istone H3. Il passo successivo è stato quindi, quello di cercare di comprendere se l'alterazione di questa modificazione epigenetica fosse coinvolta nello sviluppo del fenotipo simil depressivo-psicotico indotto dal trattamento cronico con THC in adolescenza.

## CO-TRATTAMENTO CON CHAETOCIN E ANALISI COMPORTAMENTALE

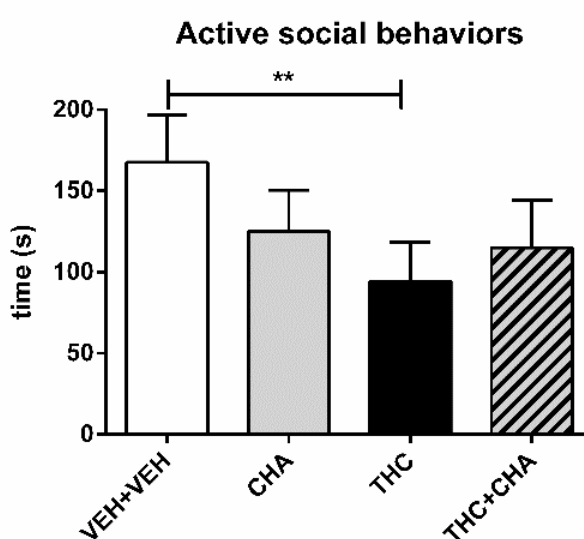
Per comprendere il ruolo svolto dall'incremento di H3K9me3 nello sviluppo del fenotipo depressivo-psicotico indotto dall'esposizione adolescenziale al THC, abbiamo deciso di co-trattare gli animali adolescenti esposti al THC con il farmaco epigenetico Chaetocin, un inibitore dell'enzima Suv39H1. Abbiamo quindi trattato gli animali dal 35 al 45 PND con Chaetocin, alla dose di 0.05 mg/Kg, una volta al giorno per via intraperitoneale (i.p.).

Al raggiungimento del PND 75, cioè 30 giorni dopo la fine del trattamento, gli animali sono stati sottoposti ad una batteria di test comportamentali atti a valutare l'effetto della somministrazione di Chaetocin sul fenotipo simil depressivo-psicotico indotto dal THC. In particolare, sono stati condotti test per la valutazione del comportamento cognitivo, sociale ed emotivo degli animali.



**Figura 9:** Effetti del co-trattamento cronico con Chaetocin (0.05mg/Kg) in ratti femmine adolescenti esposte al THC (35-45 PND) sulla memoria di riconoscimento nel test di riconoscimento del nuovo oggetto. Le figure riportano il tempo (espresso in secondi) speso dagli animali ad esplorare i due oggetti identici (oggetto familiare: fam1 e fam2) durante la fase di familiarizzazione (A), il tempo speso ad esplorare l'oggetto familiare (fam) e quello nuovo (new) durante la fase di test (B) e l'indice di discriminazione (ID). I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di almeno 5 animali per gruppo. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  verso veicolo (ANOVA a due vie, seguita dal test di Bonferroni).

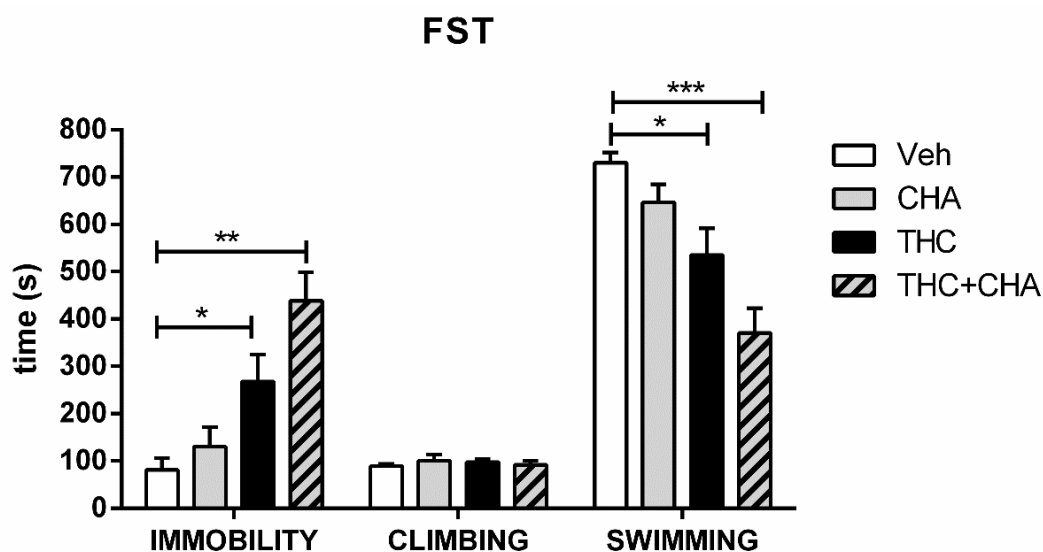
La figura 9 mostra gli effetti del trattamento con Chaetocin sul deficit della memoria di riconoscimento indotto dall'esposizione adolescenziale con THC. Nella fase di test tutti i gruppi testati spendono un tempo maggiore nell'esplorazione del nuovo oggetto, ad eccezione degli animali trattati con THC, indicando che sono in grado di distinguere l'oggetto nuovo da quello familiare. Infatti, l'ANOVA a due vie mostra una riduzione significativa dell'indice di discriminazione (DI) indotta dal trattamento con THC in adolescenza ( $F_{1,18}=9.335$ ,  $P=0.007$ ); il co-trattamento con Chaetocin è in grado di riportare l'ID ai valori controllo.



**Figura 10:** Effetti del co-trattamento cronico con Chaetocin (0.05mg/Kg) in ratti femmine adolescenti esposte al THC (35-45 PND) sui comportamenti sociali nel test di interazione sociale. La figura riporta il tempo (espresso in secondi) speso dagli animali ad interagire. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di almeno 5 animali per gruppo. \*\* $p<0.01$  verso veicolo (ANOVA a due vie, seguita dal test di Bonferroni)

L'effetto del co-trattamento con Chaetocin sul test di interazione sociale è mostrato in figura 10. In questo test solo il gruppo di animali pre-trattati con THC presenta una riduzione significativa del comportamento sociale ( $F_{1,17}=3.998$ ,  $p=0.007$ ). Purtroppo, la Chaetocin alla dose somministrata sembra indurre di per sé una leggera, seppur non significativa, riduzione nel tempo speso in attività

sociali, impedendoci così di valutare un possibile recupero dell'effetto indotto dal solo THC.



**Figura 11:** Effetti del co-trattamento cronico con Chaetocin (0.05mg/Kg) in ratti femmine adolescenti esposte al THC (35-45 PND) sul comportamentodi disperazione nella versione modificata del test del nuoto forzato al PND 75. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM di almeno 5 animali per gruppo. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  verso veicolo (ANOVA a due vie, seguita dal test di Bonferroni).

L'ANOVA a due vie mostra un effetto significativo del trattamento con THC e del co-trattamento con Chaetocin sia per il tempo speso in immobilità (THC:  $F_{1-15}=4.02$ ,  $p=0.05$ ; THC+CHA:  $F_{1-15}=6.197$ ,  $p=0.0027$ ) che per il tempo di nuoto (THC:  $F_{1-17}=3.023$ ,  $p=0.0461$ ; THC+CHA:  $F_{1-17}=5.344$ ,  $p=0.0003$ ) (fig 11). I dati ottenuti in questo test sembrano indicare che, non solo il co-trattamento con Chaetocin non è in grado di prevenire il comportamento di disperazione indotto dall'esposizione adolescenziale al THC.

Riassumendo quindi, la somministrazione di Chaetocin durante il periodo di esposizione adolescenziale al THC è in grado di prevenire i deficit cognitivi indotti dal THC, ma non è in grado di agire sulla sfera emotiva.

*DISCUSSIONE*

## DISCUSSIONE

Il consumo di Cannabis fra gli adolescenti è sempre più diffuso ed il dibattito politico a favore della sua legalizzazione ribadisce la necessità di comprendere la relazione tra esposizione precoce alla Cannabis e successivo sviluppo di patologie psichiatriche. Infatti, mentre gli studi epidemiologici sembrano suggerire un'associazione tra esposizione adolescenziale alla Cannabis e sviluppo di disturbi psichiatrici, i meccanismi molecolari alla base di questa associazione rimangono ancora sconosciuti.

I dati riportati nella presente tesi dimostrano che l'esposizione adolescenziale al THC, il principio psicoattivo della cannabis, altera il profilo trascrizionale di geni coinvolti nei processi di plasticità attraverso meccanismi epigenetici. Il principale meccanismo attraverso cui il THC modula l'espressione genica è rappresentato dall'incremento della trimetilazione della lisina 9 dell'istone H3, la quale risulta essere specificatamente mediata dall'enzima Suv39h1. L'importanza di questo evento nello sviluppo del fenotipo presente negli animali adulti è confermato dall'osservazione che il blocco farmacologico di questo enzima durante il trattamento con THC, nei ratti femmina adolescenti, previene lo sviluppo del deficit cognitivo associato al fenotipo presente in età adulta in questi animali.

### **VALUTAZIONE DELLE MODIFICAZIONI ISTONICHE**

Il primo scopo di questo progetto di tesi è stato quello di indagare se il trattamento cronico con THC in adolescenza fosse in grado di alterare le modificazioni che avvengono a livello di alcuni residui di lisina dell'istone H3.

I dati qui riportati dimostrano che il trattamento cronico con THC in adolescenza è in grado di alterare il normale rimodellamento della cromatina, inducendo cambiamenti nelle modificazioni istoniche che avvengono a livello della corteccia prefrontale. Queste alterazioni sono già visibili subito dopo la sospensione del trattamento (2 ore) dove si osserva un incremento dei livelli di H3K9me3, che diventa però più intenso 24 ore dopo l'ultima somministrazione di THC. A questo intervallo di tempo oltre ad osservare alterazioni dei marker epigenetici associati a repressione trascrizionale (H3k9me2 e H3k9me3), si evidenziano anche modificazioni dei marker associati ad attivazione



trascrizionale (H3K14Ac). Tutte queste alterazioni risultano essere transienti perchè non più presenti a 48 ore dalla sospensione del trattamento. Tuttavia, a questa stessa tempistica, si può osservare come la perdita dell'incremento di metilazione sul residuo di lisina 9 sia accompagnata da un incremento nei suoi livelli di acetilazione (33%), variazione che però non raggiunge la significatività statistica.

Il nostro risulta essere il primo studio che si è occupato di indagare gli effetti del trattamento cronico con THC in adolescenza sulle diverse modificazioni istoniche che avvengono a livello della PFC. Possiamo quindi ipotizzare che le alterazioni epigenetiche osservate possono contribuire allo sviluppo delle alterazioni comportamentali indotte dall'esposizione adolescenziale al THC nel nostro modello.

Infatti, lavori precedentemente pubblicati dal nostro gruppo di ricerca hanno evidenziato che la somministrazione cronica di THC in ratti femmine adolescenti induce cambiamenti neurobiologici a lungo termine. In particolare, il THC in adolescenza provoca la comparsa di segni comportamentali simil-depressivi e simil-psicotici in età adulta. Più specificatamente sono presenti un'aumentata immobilità nel test del nuoto forzato, una diminuita preferenza al saccarosio (indice di anedonia), deficit nella memoria spaziale di lavoro e di riconoscimento, riduzione del comportamento sociale e sensitizzazione all'iperattività indotta dalla somministrazione acuta di PCP in età adulta (Realini et al., 2011, Rubino et al., 2009; Zamberletti et al., 2013).

Questo complesso fenotipo si associa ad alterazioni profonde a carico dello sviluppo della corteccia prefrontale (Zamberletti et al., 2013; Rubino et al., 2014). Infatti, l'esposizione al THC in adolescenza altera la corretta maturazione del sistema endocannabinoide in quest'area cerebrale e questo evento sembra ripercuotersi negativamente sulla maturazione di altri sistemi neurotrasmettitoriali quali quello glutammatergico e GABAergico, conferendo così una maggiore vulnerabilità allo sviluppo di sintomi depressivi/psicotici in età adulta.

La letteratura concernente gli effetti dell'esposizione ai cannabinoidi sui meccanismi epigenetici è molto scarsa, in quanto questo rappresenta un campo ancora poco esplorato. Nel 2012, Tomasiewicz e collaboratori hanno

dimostrato che l'esposizione adolescenziale al THC, in ratti maschi, altera i livelli di dimetilazione e trimetilazione della lisina 9 sull'istone H3, nel Nucleus Accumbens, a livello dei promotori del gene *Penk*, gene che codifica per un neuropeptide oppioide, la proenkefalina. Più precisamente, a 24 ore dall'ultima somministrazione di THC, i livelli di H3K9me2 sono significativamente ridotti in due siti della regione promotore di *Penk*. Non si osservano alterazioni significative dei livelli di H3K9me3, anche se è presente una tendenza all'incremento sempre negli stessi promotori in cui la dimetilazione è ridotta. Nel nostro studio l'esposizione adolescenziale al THC altera i livelli di metilazione dell'H3K9. Infatti, i nostri risultati indicano che a 2 ore dall'ultima iniezione di THC i livelli di H3K9me3 aumentano in modo significativo, e tale incremento permane anche a 24 ore. Quindi i nostri dati si aggiungono a quelli presenti in letteratura e ampliano il quadro delle alterazioni indotte a livello epigenetico dal THC.

Nel loro insieme questi risultati sembrano suggerire che uno dei principali target istonici del trattamento cronico con THC in adolescenza sia l'incremento dell'H3K9me3. Questa ipotesi è supportata dal lavoro pubblicato da Aguado e collaboratori (2007), i quali dimostrano che gli agonisti dei recettori cannabinoidi sono in grado di aumentare il numero di cellule H3K9me3-positive in un modello di glioma. In aggiunta, in un recente studio condotto per comprendere gli effetti del THC durante una risposta immunitaria, si dimostra ancora una volta che il THC altera le modificazioni istoniche ed in modo particolare la H3K9me3 (Yang et al., 2014). Tutti questi dati, sebbene ottenuti da modelli molto differenti tra di loro suggeriscono che, indipendentemente dal modello utilizzato, il THC manifesta la sua azione a livello epigenetico attraverso la modulazione del marker repressionale H3K9me3.

Per quanto riguarda l'incremento di acetilazione della lisina 14 osservato a 24 ore dalla fine del trattamento, la nostra ipotesi è che questo evento rappresenti un meccanismo innescato dall'organismo per neutralizzare la repressione genica indotta dal THC. Questa ipotesi potrebbe essere ulteriormente avvalorata dall'osservazione che 48 ore dopo l'ultima somministrazione di THC viene a perdersi la significatività dell'incremento relativo alla metilazione dell'H3K9 (sia di- che tri-metilazione), mentre si osserva un incremento dell'acetilazione dell'H3K9 (33%, non significativamente significativo).

Una simile ipotesi di meccanismi alterati è stata proposta per la cocaina. Infatti, in seguito all'esposizione alla cocaina si osserva un rapido incremento dell'acetilazione degli istoni H3 e H4 (marker di attivazione trascrizionale) nello striato, ma allo stesso tempo, tale esposizione induce un incremento dei livelli globali di trimetilazione dell'H3K9. Si è inoltre osservato che l'inibizione della iston metiltransferasi G9a comporta una riduzione dei livelli di H3K9me3, potenziando la risposta alla cocaina e suggerendo che, in questo caso, l'incremento di H3K9me3 è il risultato di un meccanismo compensatorio messo in atto per controbilanciare gli effetti negativi dell'iperacetilazione istonica (Maze et al., 2010). E' quindi possibile ipotizzare che le sostanze di abuso inducano specifiche alterazioni epigenetiche e che a loro volta queste alterazioni inneschino meccanismi di compensazione. Tuttavia, se ciò accade in un periodo estremamente delicato come l'adolescenza, in cui le reti cerebrali non sono ancora completamente mature, questo potrebbe risultare in una deviazione della normale traiettoria di sviluppo. Questa deviazione porterebbe ad alterazioni dell'espressione genica inducendo modifiche cerebrali durature e contribuendo così allo sviluppo di patologie psichiatriche.

Riassunto, il trattamento cronico con THC in adolescenza è in grado alterare le modificazioni istoniche. Le alterazioni osservate subito dopo la sospensione del trattamento potrebbero essere importanti per l'instaurarsi dei fenomeni di tolleranza, mentre gli eventi presenti a 48 ore dall'ultima somministrazione potrebbero essere più legati alla sindrome astinenziale e/o allo sviluppo di processi maladattativi responsabili dell'insorgenza del fenotipo da noi descritto. Infatti, data l'importanza giocata dai meccanismi epigenetici nell'eziopatologia dei disturbi psichiatrici è possibile che queste alterazioni possano anche contribuire, almeno in parte, allo sviluppo del fenotipo simil depressivo-psicotico indotto dall'esposizione adolescenziale al THC.

Poichè il fenotipo simil-depressivo si sviluppa solo in seguito all'esposizione adolescenziale al THC, e non a quella adulta, se gli eventi qui discussi sono davvero importanti per lo sviluppo di tale fenotipo, non dovrebbero essere presenti dopo il trattamento cronico con THC in età adulta. Lo studio delle modificazioni istoniche presenti dopo trattamento con THC in età adulta mostra che, a 2 ore dalla fine del trattamento, si osserva un incremento significativo

dell'H3K9me3, come quello osservato in seguito all'esposizione adolescenziale. Al contrario, in tutte le tempistiche successive (24 e 48 ore) non è stata riscontrata nessuna alterazione significativa. Questi risultati confermano ancora una volta che, probabilmente, la H3K9me3 è una delle principali modificazioni istoniche compromesse dall'esposizione cronica al THC e sembra suggerire che questa potrebbe essere legata al fenomeno della tolleranza. L'incremento di H3K14ac sembra essere specificatamente legato all'esposizione adolescenziale ed in particolare, i meccanismi compensatori sembrano essere più intensi in adolescenza. Quindi risulta di fondamentale importanza il periodo di esposizione ai cannabinoidi: l'adolescenza, infatti, sembra essere una finestra temporale particolarmente sensibile agli effetti avversi del THC, avvalorando l'ipotesi che il cervello adolescente sembra essere più sensibile agli effetti deleteri delle droghe (Paus et al, 2008).

## **STUDIO DEL PROFILO GENICO**

Poichè abbiamo dimostrato che il trattamento cronico con THC in adolescenza altera le modificazioni istoniche e dato che le tali modificazioni si riflettono a livello trascrizionale, il passo successivo è stato quello di indagare se l'esposizione adolescenziale al THC fosse in grado di indurre anche alterazioni dell'espressione genica.

Essendo ormai noto che l'evento biologico che caratterizza il cervello adolescente è l'intenso rimodellamento cerebrale e che il sistema endocannabinoide sembra avere un ruolo importante nella regolazione di questo fenomeno, abbiamo investigato, tramite saggi di Realtime PCR, il profilo di espressione sia di geni appartenenti o strettamente correlati al sistema endocannabinoide che di geni coinvolti nei processi di plasticità neuronale.

I risultati ottenuti dall'analisi dei trascritti mostrano un quadro di generale downregolazione indotto dal trattamento adolescenziale con THC. Questo effetto si manifesta già a due ore dalla fine del trattamento e diventa più intenso e ampio a 24 ore, dove 17 trascritti su 37 sono significativamente ridotti.

Attualmente, in letteratura, ci sono pochi studi riguardanti le possibili modificazioni dei profili di espressione genica indotte da trattamenti cronici con

composti cannabinici. I pochi lavori presenti sono sempre relativi all'effetto del trattamento con THC, ma su aree diverse dalla corteccia prefrontale, come il cervelletto (Colombo et al., 2009), l'amigdala (Le Merrier et al., 2010), o il proencefalo (Parmentier-Batteur et al., 2002). Il nostro studio quindi risulta essere uno tra i primi lavori che cercano di analizzare l'effetto del trattamento cronico con THC sulla trascrizione genica nella corteccia prefrontale, prendendo in considerazione un pattern di geni coinvolti in modo specifico nei processi di plasticità sinaptica.

I geni che sono significativamente downregolati a 2 ore dalla fine del trattamento cronico con THC in adolescenza sono Arc e Crebbp. Arc appartiene alla classe degli Effector Immediate Early Genes. È un indice di attività neuronale in quanto svolge un ruolo importante nella plasticità sinaptica attività-dipendente. Crebbp codifica per la CRE binding protein (CBP), una proteina che si lega in modo specifico a CREB (cAMP-response element-binding protein) fosforilato ed è dotata di attività iston-acetiltransferasica.

Tra i geni rilevanti per la plasticità la cui espressione è downregolata a 24 ore, troviamo geni appartenenti al sistema neurotransmettoriale glutammatergico, come Grin2a e Grin2b (che codificano per le subunità 2A e 2B dei recettori NMDA), Gria1 (che codifica per le subunità A1 dei recettori AMPA) e Grm2 e 5 (che codificano per i recettori metabotropici del glutammato); GABAergico, come Gabbr1, Gabbr2 e Gabra2 (che codificano per le subunità del recettore GABA), Gad1 (che codifica per la glutammato decarbossilasi, enzima che sintetizza il GABA) e geni che codificano per proteine direttamente coinvolte nei processi e nelle pathway di rimodellamento sinaptico (Pdyn, Prkaca, Homer1, Pick1, Synpo, Crebbp e Adcy1).

Il recettore CB1 inibisce la via del cAMP. L'intensa stimolazione conseguita al trattamento cronico con THC può essere responsabile riduzione dei trascritti del gene Prkaca, che codifica per la subunità catalitica della proteina chinasi cAMP-dipendente (PKA), e del gene Adcy, che codifica per l'adenilato ciclasi1.

In aggiunta, 9 geni che codificano per i sistemi glutammatergico e GABAergico risultano essere significativamente downregolati. Il sistema endocannabinoide svolge un ruolo chiave nella regolazione dell'equilibrio tra sistema

glutamatergico e GABAergico (Marsicano et al., 2003; Katona and Freund, 2008). È quindi plausibile che l'esposizione adolescenziale al THC, alterando lo steady state delle modificazioni istoniche che avvengono fisiologicamente nel cervello adolescente, possa indurre alterazioni dei processi trascrizionali dei quei geni appartenenti ai sistemi neurotrasmettitoriali fortemente controllati dal sistema endocannabinoide, quali quello glutamatergico e GABAergico.

Un'altro gene che risulta essere fortemente downregolato a 24 ore dalla fine del trattamento è *Pick1*. *Pick1* codifica per l'omonima proteina PICK1 (protein interacting with C kinase) che interagisce con diverse proteine. Tra i suoi interattori troviamo i recettori glutamatergici. Infatti, *Pick1* regola il trafficking della subunità GluA2 del recettore AMPA e influenza, così, l'attività delle sinapsi eccitatorie (Dev & Henley, 2006). In alcune patologiche e psichiatriche, la regolazione di alcuni bersagli di *Pick1* tra cui la subunità GluA2 del recettore AMPA, il trasportatore della dopamina (DAT) e la serina racemasi (SR) risulta modificata, perciò è probabile che le alterazioni di *Pick1* possano partecipare allo sviluppo di disordini neurologici e psichiatrici (Dev & Henley, 2006).

Questo forte e generale effetto di downregolazione osservato fino a 24 ore dalla fine del trattamento, a fronte delle alterazioni osservate a livello istonico, potrebbe essere giustificato dall'incremento di di- e tri-metilazione della lisina 9 dell'istone H3 osservato tra le 2 e le 24 ore dopo l'ultima iniezione.

A 48 ore dall'ultima iniezione di THC, il quadro appare ben diverso. I livelli di tutti i messaggeri vengono riportati a controllo, mentre i livelli di mRNA di *Gria2*, *Grm2*, *Gabbr1*, *Gad1* e *Sirt1* risultano essere significativamente aumentati. La nostra ipotesi è che in seguito al grosso effetto di repressione genica indotto dal trattamento cronico con THC, il cervello adolescente risponda innescando un meccanismo atto a cotrobilanciare la downregolazione osservata, quindi aumentando inizialmente l'acetilazione dell'H3K14 e poi l'acetilazione della K9, responsabili dell'incrementata attività trascrizionale che si osserva tra le 24 e 48 ore dopo l'ultimo THC.

Per valutare se negli animali pre-esposti al THC durante il periodo adolescenziale le alterazioni a carico dei livelli di messaggero fossero stabili o transienti, lo stesso

pannello di analisi è stato condotto a 30 (PND 75) giorni dopo l'ultima iniezione di THC, quando il fenotipo simil depressivo-psicotico è presente. I risultati ottenuti dai saggi di RealTime condotti al PND 75 indicano che a questa tempistica 8 geni risultano essere significativamente alterati. Tra questi vi sono i messaggeri di *Gria1*, *Gria2*, *Grm3*, *Gabra1*, *Abat*, *Dlg4* e *Ntrk12* che sono significativamente incrementati, mentre solo il messaggero del gene *Reln*, che codifica per la Relina, risulta essere fortemente down-regolato. È probabile che la maggior parte degli eventi innescati dal trattamento cronico con THC in adolescenza vengano recuperati al raggiungimento dell'età adulta, fuorchè i livelli trascrizionali di alcuni geni, tra cui *Gria1* e *Reln*, che sono particolarmente interessanti per il fenotipo mostrato da questi animali.

*Gria1* codifica per la subunità GluA1 dei recettori ionotropici del glutammato (AMPA). La maggior parte dei recettori AMPA presenti a livello cerebrale sono dimeri che contengono le subunità A1 e A2. Un incremento di subunità A1 non accompagnato da quello di A2 fa ipotizzare un aumento di recettori AMPA contenenti la sola subunità A1. Questi recettori hanno la caratteristica di essere permeabili al calcio. I recettori AMPA permeabili al calcio sono espressi a livello neuronale e il loro numero sembra upregolato nei pazienti schizofrenici (Eastwood et al., 1995; Beneyto & Meador-Woodruff, 2006) e in altri disordini psichiatrici, come la dipendenza da droghe (Bellone & Luscher, 2006; Conrad et al., 2008; Van den Oever et al., 2008). In linea con questi studi, recenti risultati ottenuti dal nel nostro gruppo di ricerca dimostrano, negli animali adulti trattati con THC in adolescenza, un aumento dei livelli della subunità del recettore AMPA GluA1 nella PFC (Rubino et al., 2014).

La relina è una proteina espressa e rilasciata principalmente dagli interneuroni corticali e ippocampali GABAergici (Rodriguez et al., 2000). Recenti studi hanno dimostrato che questa proteina contribuisce alla formazione delle sinapsi agendo come modulatore della trasmissione sinaptica, regolando l'ingresso di calcio attraverso i recettori NMDA (Beffert et al., 2005; Chen et al., 2005; Ventruti et al., 2011). Inoltre, sembra giocare un ruolo importante nell'assemblaggio dei recettori NMDA (Groc et al., 2007). Durante lo sviluppo postnatale del sistema nervoso centrale, la maturazione delle sinapsi partecipa al perfezionamento delle reti neuronali immature. Inoltre, la plasticità sinaptica tipica dell'adulto è

spesso associata con la maturazione delle sinapsi glutamatergiche e questo comporta l'assunzione e/o la stabilizzazione dei recettori ionotropici del glutammato (Garner et al, 2002;.. Groc et al, 2006a). I recettori NMDA (NMDARs) sono recettori eteromerici composti dalla subunità NR1 in combinazione con la subunità NR2 (NR2A-NR2D) o NR3. Il pattern di espressione delle diverse subunità NR2 dipende dalla regione cerebrale e dallo stadio di sviluppo. Si è infatti osservato che la maggior parte delle sinapsi eccitatorie nelle fasi iniziali di sviluppo sono ricche di recettori NMDA contenenti la subunità 2B, ma gradualmente vengono sostituiti e/o integrati da quelli contenenti la subunità 2A (Monyer et al, 1994; Sheng et al, 1994; Shi et al, 1997; Kew et al, 1998; Li et al, 1998). E' stato dimostrato che la relina regola la composizione delle subunità dei recettori NMDA e controlla il trasporto in superficie della subunità 2B. Infatti, a livello delle sinapsi attive vi è una ridotta partecipazione del recettore NR1/NR2B alle correnti NMDA-mediate in concomitanza con l'accumulo di relina. Inoltre, si è osservato che l'inibizione della relina riduce la mobilità dei recettori NMDA-2B, ma aumenta il loro tempo di permanenza nella sinapsi (Groc et al, 2007). È interessante notare che nel nostro modello, al PND 75, in concomitanza con la riduzione significativa dell'mRNA della relina abbiamo osservato un incremento significativo nei livelli della subunità 2B del recettore NMDA (Rubino et al., 2014). È quindi possibile che le alterazioni della relina possano essere in parte responsabili dell'anomala trasmissione glutamatergica, la quale sembra avere un ruolo chiave nei disturbi neuropsichiatrici come la schizofrenia (Mohn et al, 1999;.. Tsai e Coyle, 2002; Fatemi, 2005). A supporto di ciò, diversi studi suggeriscono il coinvolgimento della relina nella eziopatologia della schizofrenia. In linea con questa ipotesi, è stato dimostrato che a livello della corteccia prefrontale di pazienti schizofrenici vi sono ridotti livelli del suo messaggero (Eastwood and Harrison, 2006; Giudotti et al., 2000). In accordo con questa osservazione, anche noi riscontriamo una forte downregolazione dei livelli dell'mRNA della relina negli animali adulti pre-trattati con THC.

In generale, la presenza di queste alterazioni trascrizionali in età adulta, in concomitanza con l'insorgenza del fenotipo simil depressivo-psicotico, suggerisce fortemente una loro correlazione con lo sviluppo delle alterazioni comportamentali osservate in questi animali.



Ancora una volta, il quadro di alterazioni è profondamente diverso quando il trattamento con THC viene condotto in età adulta. Infatti, in questi animali non è possibile osservare il marcato effetto di downregolazione invece presente a 24 ore dall'ultima iniezione di THC negli animali adolescenti. Infatti, negli animali trattati durante l'età adulta, solo i messaggeri di 5 geni risultano essere significativamente ridotti: *Ppara*, *Grm2*, *Pick1* e *Reln*, mentre solo l'espressione del gene che codifica per *Bdnf* risulta essere significativamente incrementato rispetto agli animali controllo. Risulta quindi evidente che l'esposizione al THC in età adulta non sia in grado di indurre modificazioni dei trascritti così profonde come quelle osservate in seguito al trattamento in adolescenza. Un dato interessante, osservato solo negli animali trattati in età adulta, è l'upregolazione di BDNF. BDNF (brain-derived neurotrophic factor) è una neurotrofina in grado di regolare lo sviluppo neuronale e la plasticità sinaptica (Huang & Reichardt, 2001) ed è ampiamente espresso nel cervello (Lessmann et al., 2003). Un'up-regolazione dell'espressione di BDNF è stata osservata in associazione a diverse droghe d'abuso, come amfetamina (Meredith, et al., 2002), morfina (Numan, et al., 1998) e cocaina (Grimm et al., 2003). Alla luce di questi risultati Butovsky e collaboratori (Butovsky, et al., 2005) hanno trattato ratti adulti (12-15 settimane) del ceppo Sprague-Dawley per 7 giorni con iniezioni ip di  $\Delta^9$ -THC (1,5 mg/Kg) e hanno poi eseguito saggi di RealTime-PCR in diverse aree cerebrali (NAc, VTA, BLA, mPFC, PVN, ippocampo e striato dorsale). I risultati ottenuti dimostrano che il trattamento cronico con THC induce un significativo aumento di espressione di BDNF nel NAc e in aree implicate nel circuito della gratificazione, come la mPFC e la VTA. Gli autori suggeriscono che la somministrazione di THC possa influenzare l'espressione di BDNF attraverso l'attivazione di ERK (extracellular signal-regulated kinase), dal momento che ERK fosforilata regola geni contenenti nel promotore l'elemento CRE, come BDNF. I nostri dati sembrano quindi essere in linea con quanto riportato da Butovsky. È da notare, però, che questo aumento si osserva solo quando il trattamento è eseguito nei ratti adulti.

Un gene che risulta essere invece fortemente downregolato sia nei ratti adulti che adolescenti dopo 24 ore dalla fine del trattamento è *Pick1*. È quindi possibile che *Pick1* sia un bersaglio che viene downregolato dal trattamento cronico con THC indipendentemente dal periodo di esposizione. È importante però notare

che mentre negli adolescenti la riduzione del messaggero di Pick1 è accompagnata da una riduzione dei trascritti relativi a diverse subunità dei recettori per il glutammato, negli adulti questo non accade. Una possibile spiegazione potrebbe risiedere nella presenza nel cervello adolescente di intensi fenomeni di rimodellamento, che non sono invece così consistenti nel cervello adulto. Questo potrebbero rendere le alterazioni di Pick1 particolarmente significative durante il periodo adolescenziale, in quanto rappresenta un elemento chiave nei processi di plasticità sinaptica. Lo stesso ipotesi potrebbe essere estesa anche per le osservazioni sulla retina. Studi futuri verranno allestiti per comprendere se effettivamente le alterazioni osservate tra gli animali adolescenti ed adulti, a fronte di un diverso fenotipo sviluppato a lungo termine, siano determinate anche da una differente capacità di recuperare in modo corretto le alterazioni indotte dal THC.

In conclusione, considerando l'elevato numero di geni implicati nella plasticità sinaptica che risultano significativamente diminuiti dal trattamento con THC in adolescenza (17 geni su 37), ma non in età adulta (5 geni su 37), possiamo dire che il periodo di esposizione al THC risulta fondamentale nel determinare gli effetti del trattamento sulla trascrizione. I dati suggeriscono che l'abuso di cannabis in questa particolare finestra temporale ha ripercussioni sia sulla trascrizione di geni correlati al sistema endocannabinoide sia coinvolti nei processi di plasticità sinaptica. Inoltre, a fronte di una così forte e generale downregolazione osservata in seguito al trattamento cronico in adolescenza è lecito ipotizzare che vi sia il coinvolgimento di qualche fattore trascrizionale il quale, agendo a monte dei processi di trascrizione ed essendo alterato dal trattamento stesso, sia in grado di modulare l'espressione di un set così ampio di geni. Ulteriori indagini verranno quindi finalizzate alla ricerca di tale o tali fattori coinvolti.

Riassumendo, i risultati ottenuti indicano che il trattamento cronico con THC in adolescenza induce una intensa downregolazione di geni che codificano per il sistema endocannabinoide e di geni coinvolti nei processi di rimodellamento sinaptico. Tale effetto non è presente quando il trattamento viene condotto in età adulta sottolineando, ancora una volta, la vulnerabilità del periodo adolescenziale agli effetti avversi del THC. A tale fenomeno di downregolazione,

riscontrato fino a 24 ore dall'interruzione del trattamento, segue un incremento dei processi trascrizionali, evento messo in atto dall'organismo probabilmente per controbilanciare la forte repressione indotta dal trattamento stesso. L'incremento di trascrizione potrebbe essere associato ad un aumento dei livelli di acetilazione dell'istone H3 da noi evidenziato dopo 24 ore dalla fine del trattamento. Queste modificazioni si modulano fino al raggiungimento dell'età adulta, dove permangono alterati pochi, ma significativi geni tra cui *Gria1* e *Reln*. Questo quadro potrebbe essere quindi alla base dello sviluppo del fenotipo simil depressivo e simil psicotico rilevato negli animali adulti pretrattati con THC.

### **ANALISI DEI LIVELLI PROTEICI DI SUV39H1**

I nostri dati indicano che il principale evento epigenetico indotto dall'esposizione cronica al THC è un incremento dei livelli di H3K9me3, quindi il passo successivo è stato quello di valutare l'espressione dei principali enzimi responsabili della metilazione dell'H3K9, in seguito al trattamento adolescenziale con THC.

I risultati ottenuti mostrano che 2 e 24 ore dopo l'ultima iniezione di THC, a livello della corteccia prefrontale, aumentano significativamente i livelli di Suv39h1, mentre non si riscontrano alterazioni dei livelli di G9a (dati non mostrati) un'altro enzima responsabile della metilazione della K9 sull'istone H3.

In letteratura diversi lavori dimostrano che i cambiamenti a lungo termine indotti dalle droghe sulla trascrizione genica e sull'attività neuronale spesso coinvolgono la metilazione dell'H3K9 e degli enzimi che catalizzano questa modificazione. Infatti, un lavoro pubblicato da Maze e collaboratori dimostra che il trattamento cronico con cocaina induce una riduzione della metilazione dell'H3K9 nel nucleus accumbens accompagnato in parallelo da una riduzione dell'enzima G9a (2010). Quando questa riduzione viene bloccata, il trattamento cronico con cocaina non induce nè le alterazioni comportamentali nè i cambiamenti morfologici. Una simile riduzione dei livelli di G9a, ma accompagnata anche dalla riduzione dei livelli di Suv39h1 e HDAC1-3 si osserva anche dopo l'esposizione cronica all'etanolo. Infine, è stato dimostrato che anche l'esposizione cronica alle amfetamine induce un incremento significativo dei

livelli di metilazione della H3K9 così come dei livelli di SUV39H1 (Renthal et al. 2008).

### **COTRATTAMENTO CON CHAETOCIN E ANALISI COMPORTAMENTALE**

I dati ottenuti suggeriscono che l'incremento di trimetilazione dell'H3K9 osservato dopo il trattamento adolescenziale con THC a 2 e 24 ore sia dovuto all'incremento dell'enzima Suv39h1.

Data l'importanza della modificazione istonica repressiva H3K9me3, la quale è implicata in diversi disturbi neurologici e psichiatrici come l'atassia di Friedreich, il morbo di Huntington e la dipendenza da droghe, l'ultimo obiettivo di questa tesi è stato quello di comprendere il ruolo svolto dall'incremento di H3K9me3 nello sviluppo del fenotipo simil depressivo-psicotico indotto dall'esposizione adolescenziale al THC. A tale scopo abbiamo co-trattato gli animali adolescenti esposti al THC con il farmaco epigenetico Chaetocin, un inibitore dell'enzima Suv39H1 (Greiner D et al., 2005).

Non è la prima volta che un farmaco epigenetico viene utilizzato per recuperare le alterazioni comportamentali presenti in modelli animali di patologie psichiatriche.

Infatti, grazie alle nuove conoscenze acquisite, oggi sappiamo che alla base di una grande varietà di malattie e psichiatriche è presente una profonda disregolazione dell'espressione genica. Da qui nasce l'importanza di utilizzare i farmaci epigenetici per ripristinare i pattern di espressione genica e la funzione neuronale. In letteratura esistono numerosi studi che si sono occupati di investigare, in diversi modelli animali, gli effetti dei farmaci epigenetici sulla modulazione delle alterazioni comportamentali: Tsankova e collaboratori furono i primi a chiarire il possibile meccanismo d'azione epigenetico per gli effetti antidepressivi dell'imipramina (Tsankova et al., 2006). Successivamente fu scoperto che anche gli inibitori selettivi delle HDAC I, come l'MS-275, hanno effetti antidepressivi (Covington et al., 2009). Infatti, la somministrazione di MS-275 reverte gli effetti indotti dal modello di stress cronico di sconfitta sociale sui livelli globali di espressione genica, in modo del tutto paragonabile ai classici antidepressivi come la fluoxetina.

In aggiunta è stato dimostrato che oltre agli inibitori delle iston-deacetilasi, anche gli inibitori della metilazione del DNA hanno un effetto antidepressivo. La somministrazione sistemica e/o intraippocampale di 5-azaD o 5-azaC riduce il tempo speso in immobilità nel test del nuoto forzato e nel test di sospensione (Sales et al., 2011).

Ad oggi però non esistono dati sull'utilizzo della Chaetocin come farmaco per il trattamento dei disturbi psichiatrici, quindi il nostro risulta essere il primo studio che prende in considerazione questo aspetto. I test comportamentali condotti al PND 75, time-point in cui gli animali raggiungono l'età adulta e si sviluppa il fenotipo simil depressivo-psicotico, hanno dimostrato che il cotrattamento con Chaetocin è in grado di prevenire i deficit cognitivi indotti dall'esposizione adolescenziale al THC, ma non quelli della sfera emotiva. Si potrebbe pertanto suggerire che la presenza dell'incremento di H3K9me3 nella corteccia prefrontale potrebbe partecipare allo sviluppo dei soli deficit cognitivi presenti nei nostri ratti adulti esposti al THC in adolescenza. Resta ancora da chiarire quali siano i meccanismi alla base dello sviluppo dei deficit della sfera emotiva.

In conclusione, i nostri risultati indicano che l'esposizione adolescenziale al THC agisce a livello epigenetico inducendo alterazioni delle modificazioni istoniche. In questo modo, gli effetti epigenetici dell'esposizione adolescenziale al THC si ripercuotono a livello trascrizionale inducendo alterazioni a breve e/o a lungo termine in specifici geni coinvolti nei processi di plasticità sinaptica. È importante notare che gli effetti osservati sia a livello istonico che trascrizionale sembrano essere età-dipendenti, indicando una maggiore vulnerabilità del cervello adolescente agli effetti avversi del THC. I nostri risultati depongono a favore del coinvolgimento della trimetilazione della lisina 9 sull'istone H3 nello sviluppo delle almeno alcune alterazioni comportamentali osservate negli animali adulti pre-esposti al THC. Infatti, la somministrazione di un inibitore dell'enzima Suv39h1 durante l'esposizione adolescenziale al THC previene la comparsa dei deficit cognitivi osservati in età adulta.

Ulteriori studi saranno necessari per ricercare quali meccanismi epigenetici possano essere coinvolti nello sviluppo dei deficit della sfera emotiva indotti dall'esposizione adolescenziale al THC.

# *BIBLIOGRAFIA*

## BIBLIOGRAFIA

Abdolmaleky HM, Cheng KH, Faraone SV, Wilcox M, Glatt SJ, Gao F, Smith CL, Shafa R, Aiali B, Carnevale J, Pan H, Papageorgis P, Ponte JF, Sivaraman V, Tsuang MT, Thiagalingam S. Hypomethylation of MB-COMT promoter is a major risk factor for schizophrenia and bipolar disorder. *Hum Mol Genet.* 2006; 15(21):3132–45. [PubMed: 16984965]

Abdolmaleky HM, Smith CL, Zhou JR, Thiagalingam S. Epigenetic alterations of the dopaminergic system in major psychiatric disorders. *Methods Mol Biol.* 2008; 448:187–212.

Abush H, Akirav I. Short- and long-term cognitive effects of chronic cannabinoids administration in late-adolescence rats. *PLoS One.* 7: e31731, 2012.

Aguado T, Carracedo A, Julien B, Velasco G, Milman G, Mechoulam R, Alvarez L, Guzmán M, Galve-Roperh I. Cannabinoids induce glioma stem-like cell differentiation and inhibit gliomagenesis. *J Biol Chem.* 2007 Mar 2;282(9):6854-62.

Akbarian S. The molecular pathology of schizophrenia-Focus on histone and DNA modifications. *Brain Res Bull.* 2009

Amery A, (1998) The effect of cannabinoids on the brain. *Prog. Neurobiol* 58:315-348.

Andersen SL, Thompson AT, Rutstein M, Hostetter JC, Teicher MH. (2000) Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse* 37(2):167-9.

Andreano JM, Cahill L. Sex influences on the neurobiology of learning and memory. *Learn Mem.* 16: 248-66, 2009.

Arseneault L, Cannon M, Fisher HL, Polanczyk G, Moffitt TE, Caspi A. Childhood trauma and children's emerging psychotic symptoms: a genetically sensitive longitudinal cohort study. *Am J. Psychiatry*, 2011: 65-72.

Arseneault L, Cannon M, Poulton R, Murray R, Caspi A, Moffitt TE. Cannabis use in adolescence and risk for adult psychosis: longitudinal prospective study. *BMJ.* 325: 1212–1213, 2002.

- Autry AE, Monteggia LM. Epigenetics in suicide and depression. *Biol Psychiatry*. 2009; 66(9):812–3.
- Bambico FR, Nguyen NT, Katz N, Gobbi G. Chronic exposure to cannabinoids during adolescence but not during adulthood impairs emotional behaviour and monoaminergic neurotransmission. *Neurobiol Dis*. 37: 641–655, 2010.
- Beffert U, Weeber EJ, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt JD, Li WP, Adelmann G, Frotscher M, Hammer RE, Herz J. Modulation of synaptic plasticity and memory by Reelin involves differential splicing of the lipoprotein receptor Apoer2. *Neuron*. 2005 Aug 18;47(4):567-79.
- Bellone, C., e C. Luscher. Cocaine triggered AMPA receptor redistribution is reversed in vivo by mGluR-dependent long-term depression. *Nat. Neurosci*. 9, 2006: 636-641.
- Beneyto, M., e J.H. Meador-Woodruff. Lamina-specific abnormalities of AMPA receptor trafficking and signaling molecule transcripts in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Synapse*, 60, 2006: 585-598.
- Bird, A. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 and neurological disease. *Biochem. Soc. trans.*, 36, 2008: 575-583.
- Biscaia M, Marín S, Fernández B, Marco EM, Rubio M, Guaza C, Ambrosio E, Viveros MP. Chronic treatment with CP 55,940 during the periadolescent period differentially affects the behavioural responses of male and female rats in adulthood. *Psychopharmacology (Berl)*. 170: 301–308, 2003.
- Bisogno T, Delton-Vandenbroucke I, Milone A, Lagarde M, Di Marzo V. Biosynthesis and inactivation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) and Ndocosahexaenylethanolamine in bovine retina. *Arch Biochem Biophys*. 370:300-307.
- Blakemore SJ. Teenage kicks: cannabis and the adolescent brain. *Lancet*. 381: 888-9, 2013.
- Borrelli, E., E.J. Nestler, C.D. Allis, e P. Sassone-Corsi. Decoding the epigenetic language of neuronal plasticity. *Neuron* 60, 2008: 961-974.



- Bouaboula M., Poinot-Chazel C., Bourrie B., Canat X., Calandra B., Rinaldi-Cormona M., Le Fur G., Casellas P. (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J.* 312: 637-641
- Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology (Berl)*. 156: 234-258, 2001.
- Burkey TH, Quock RM, Consroe P, Ehler FJ, Hosohata Y, Roeske WR, Yamamura HI. (1997) Relative efficacies of cannabinoid CB1 receptor agonists in the mouse brain. *Eur J Pharmacol.* 336:295-298.
- Butovsky, E., et al. «In vivo up regulation of brain-derived neurotrophic factor in specific brain areas by chronic exposure to delta-9-tetrahydrocannabinol.» *Journal of Neurochemistry*, 93, 2005: 802-811.
- Cadas H, di Tomaso E, Piomelli D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. *J Neurosci.* 1997 Feb 15;17(4):1226-42.
- Cadoni C, Simola N, Espa E, Fenu S, Di Chiara G. Strain dependence of adolescent Cannabis influence on heroin reward and mesolimbic dopamine transmission in adult Lewis and Fischer 344 rats. *Addict Biol.* Aug 20, 2013.
- Cass DK, Flores-Barrera E, Thomas DR, Vital WF, Caballero A, Tseng KY. CB1 cannabinoid receptor stimulation during adolescence impairs the maturation of GABA function in the adult rat prefrontal cortex. *Mol Psychiatry.* 2014 May;19(5):536-43. doi: 10.1038/mp.2014.14.
- Chadwick B, Miller ML, Hurd YL. Cannabis Use during Adolescent Development: Susceptibility to Psychiatric Illness. *Front Psychiatry.* 4: 129, 2013.
- Chambers R.A., Taylor J.R., Potenza M.N. Developmental neurocircuitry of motivation in adolescence: a critical period of addiction vulnerability. *Am. J. Psychiatry* 160, 2003: 1041-1052.

- Chambon P. (1978) The molecular biology of the eukaryotic genome is coming of age. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 42, 1209-1234.
- Chawla, S., P. Vanhoutte, F.J. Arnold, C.L. Huang, e H. Bading. Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5. J. Neurochem., 85, 2003: 151-159.
- Chen Y, Beffert U, Ertunc M, Tang TS, Kavalali ET, Bezprozvanny I, Herz J. Reelin modulates NMDA receptor activity in cortical neurons. J Neurosci. 2005 Sep 7;25(36):8209-16.
- Chen Y, Sharma RP, Costa RH, Costa E, Grayson DR. On the epigenetic regulation of the human reelin promoter. Nucleic Acids Res. 2002; 30(13):2930-9. [PubMed: 12087179]
- Cleveland HH, Wiebe RP. Understanding the association between adolescent marijuana use and later serious drug use: gateway effect or developmental trajectory? Dev Psychopathol. 20: 615-32, 2008.
- Cohen-Cory, S. The developing synapse: construction and modulation of synaptic structures and circuits. Science 298, 2002: 770-776.
- Colombo, G., et al. Transcriptomic and Proteomic analyses of mouse cerebellum reveals alterations in RasGRF1 expression following in vivo chronic treatment with delta9-tetrahydrocannabinol. J. Mol. Neurosci. 37, 2009: 111-122.
- Conrad, K.L., et al. Formation of accumbens GluR2-lacking AMPA receptors mediates incubation of cocaine craving. nature, 454, 2008: 118-121.
- Costa E, Chen Y, Davis J, Dong E, Noh JS, Tremolizzo L, Veldic M, Grayson DR, Guidotti A. REELIN and schizophrenia: a disease at the interface of the genome and the epigenome. Mol Interv. 2002; 2(1):47-57.
- Covington HE, Maze I, LaPlant QC, Vialou VF, Ohnishi YN, Berton O, Fass DM, Renthal W, Rush AJ 3rd, Wu EY, Ghose S, Krishnan V, Russo SJ, Tamminga C, Haggarty SJ, Nestler EJ. Antidepressant actions of histone deacetylase inhibitors. J Neurosci. 2009 Sep 16;29(37):11451-60.

Crews F, He J, Hodge C. Adolescent cortical development: a critical period of vulnerability for addiction. *Pharmacol Biochem Behav.* 2007 Feb;86(2):189-99.

de Graaf R, Radovanovic M, van Laar M, Fairman B, Degenhardt L, Aguilar-Gaxiola S, Bruffaerts R, de Girolamo G, Fayyad J, Gureje O, Haro JM, Huang Y, Kostychenko S, Lépine JP, Matschinger H, Mora ME, Neumark Y, Ormel J, Posada-Villa J, Stein DJ, Tachimori H, Wells JE, Anthony JC. Early cannabis use and estimated risk of later onset of depression spells: Epidemiologic evidence from the population-based World Health Organization World Mental Health Survey Initiative. *Am J Epidemiol.* 172: 149–159, 2010.

Decoster J, van Os J, Kenis G, Henquet C, Peuskens J, De Hert M, van Winkel R. Age at onset of psychotic disorder: cannabis, BDNF Val66Met, and sex-specific models of gene-environment interaction. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 156B: 363-9, 2011.

Degenhardt L, Dierker L, Chiu WT, Medina-Mora ME, Neumark Y, Sampson N, Alonso J, Angermeyer M, Anthony JC, Bruffaerts R, de Girolamo G, de Graaf R, Gureje O, Karam AN, Kostyuchenko S, Lee S, Lépine JP, Levinson D, Nakamura Y, Posada-Villa J, Stein D, Wells JE, Kessler RC. Evaluating the drug use "gateway" theory using cross-national data: consistency and associations of the order of initiation of drug use among participants in the WHO World Mental Health Surveys. *Drug Alcohol Depend.* 108: 84-97, 2010

Dekaban AS. Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann Neurol.* 1978 Oct;4(4):345-56.

Dev K.K., e J.M. Henley. The schizophrenic faces of PICK1. *Trends Pharmacol. Sci.,* 27, 2006: 574-579.

Devane WA, Breuer A, Sheskin T, Järbe TU, Eisen MS, Mechoulam R. A novel probe for the cannabinoid receptor. *J Med Chem.* 1992 May 29;35(11):2065-9.

Di Forti M, Morgan C, Dazzan P, Pariente C, Mondelli V, Marques TR, Handley R, Luzi S, Russo M, Paparelli A, Butt A, Stilo SA, Wiffen B, Powell J, Murray RM. High-

potency cannabis and the risk of psychosis. *Br J Psychiatry*. 2009 Dec;195(6):488-91.

Di Forti M, Sallis H, Allegri F, Trotta A, Ferraro L, Stilo SA, Marconi A, La Cascia C, Reis Marques T, Pariante C, Dazzan P, Mondelli V, Paparelli A, Kolliakou A, Prata D, Gaughran F, David AS, Morgan C, Sthl D, Khondoker M, Maccabe JH, Murray RM. Daily Use, Especially of High-Potency Cannabis, Drives the Earlier Onset of Psychosis in Cannabis Users. *Schizophr Bull*. Dec 17, 2013.

Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Sep;3(9):771-84.

Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L. (2001) Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol Sci* 22(7):346-9.

Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature*. 1994 Dec 15;372(6507):686-91.

Di Marzo V. The endocannabinoid system: its general strategy of action, tools for its pharmacological manipulation and potential therapeutic exploitation. *Pharmacol. Res.* 60, 2009: 77-84

Doi, M., J. Hirayama, e P. Sassone-Corsi. Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell*. 125, 2006: 497-508.

Dwivedi Y, Rizavi HS, Conley RR, Roberts RC, Tamminga CA, Pandey GN. Altered gene expression of brain-derived neurotrophic factor and receptor tyrosine kinase B in postmortem brain of suicide subjects. *Arch Gen Psychiatry*. 2003; 60(8):804-15.

Eastwood SL, Harrison PJ. Cellular basis of reduced cortical reelin expression in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2006 Mar;163(3):540-2.

Eastwood, S.L., B. McDonald, P.W. Burnet, J.P. Beckwith, R.W. Kerwin, e P.J. Harrison. Decreased expression of mRNAs encoding non-NMDA glutamate receptors GluR1 and GluR2 in medial temporal lobe neurons in schizophrenia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 29, 1995: 211-223.

Ernst C, Deleva V, Deng X, Sequeira A, Pomarenski A, Klempan T, Ernst N, Quirion R, Gratton A, Szyf M, Turecki G. Alternative splicing, methylation state, and expression profile of tropomyosin-related kinase B in the frontal cortex of suicide completers. *Arch Gen Psychiatry*. 2009; 66(1):22–32.

Fatemi SH (2005) Reelin glycoprotein in autism and schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 71:179–187.

Felder CC, Nielsen A, Briley EM, Palkovits M, Priller J, Axelrod J, Nguyen DN, Richardson JM, Riggan RM, Koppel GA, Paul SM, Becker GW. (1996) Isolation and measurement of the endogenous cannabinoid receptor agonist, anandamide, in brain and peripheral tissues of human and rat. *FEBS letters* 393 231-235.

Felsenfeld, G., e M. Groundine. Controlling the double helix. *nature* 421, 2003: 448-453.

File SE, Hyde JR. Can social interaction be used to measure anxiety? *Br J Pharmacol*. 62: 19–24, 1978.

Fischle, W., F. Dequiedt, M.J. Hendzel. Enzymatic activity associated with class II HDACs is dependent on a multiprotein complex containing HDAC3 and SMRT/N-CoR.» *Mol. Cell.*, 9, 2002: 45-57.

Fortin DA, Levine ES. Differential effects of endocannabinoids on glutamatergic and GABAergic inputs to layer 5 pyramidal neurons. *Cereb Cortex*. 2007 Jan;17(1):163-74.

Freeman WM, Patel KM, Brucklacher RM, Lull ME, Erwin M, Morgan D, Roberts DC, Vrana KE. Persistent alterations in mesolimbic gene expression with abstinence from cocaine selfadministration. *Neuropsychopharmacology*. 2008; 33(8):1807–17. [PubMed: 17851536]

Freund TF1, Katona I, Piomelli D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev*. 2003 Jul;83(3):1017-66.

Fride E. Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005 Dec;4(6):633-42.

- Fuchikami M, Morinobu S, Kurata A, Yamamoto S, Yamawaki S. Single immobilization stress differentially alters the expression profile of transcripts of the brain-derived neurotrophic factor(BDNF) gene and histone acetylation at its promoters in the rat hippocampus. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2009; 12(1):73–82.
- Galve-Roperh I., Palazuelos J., Aguado T., Guzmàn M. The endocannabinoid system and the regulation of neural development: potential implications in psychiatric disorders. *Eur Arch psychiatry Clin Neurosci* 259, 2009: 371-382.
- Gaoni Y., Mechoulam R. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish.» *J. Am. Chem. Soc.* 86, 1964: 1646-1647.
- Garner CC, Zhai RG, Gundelfinger ED, Ziv NE (2002) Molecular mechanisms of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci* 25:243–251.
- Geyer MA. Developing translational animal models for symptoms of schizophrenia or bipolar mania. *Neurotox Res.* 14: 71–78, 2008.
- Gibney, E.R., e C.M. Nolan. Epigenetics and gene expression. *Heredity*, 105, 2010: 4-13.
- Gogtay, N., et al. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2004: 8174-8179.
- Goll, M.G., F. Kirpekar, K.A. Maggert, et al. Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311, 2006: 395-398.
- Graff J, Mansuy IM. Epigenetic dysregulation in cognitive disorders. *Eur J Neurosci*. 2009; 30(1):1–8. [PubMed: 19508697]
- Greiner D, Bonaldi T, Eskeland R, Roemer E, Imhof A. Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat Chem Biol*. 2005 Aug;1(3):143-5.
- Grimm, J.W., L. Lu, T. Hayashi, B. Hope, T.P. Su, e Y. Shaham. «Time-dependent increases in brain-derived neurotrophic factor protein levels within the

mesolimbic dopamine system after withdrawal from cocaine: implications for incubation of cocaine craving.» *J. Neurosci.* 23, 2003: 742-747.

Groc L, Choquet D (2006) AMPA and NMDA glutamate receptor trafficking: multiple roads for reaching and leaving the synapse. *Cell Tissue Res* 326:423-438.

Groc L, Choquet D, Stephenson FA, Verrier D, Manzoni OJ, Chavis P. NMDA receptor surface trafficking and synaptic subunit composition are developmentally regulated by the extracellular matrix protein Reelin. *J Neurosci.* 2007 Sep 19;27(38):10165-75.

Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D, Costa E. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry.* 2000 Nov;57(11):1061-9.

Haigis, M.C., e L.P. Guarente. Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev.*, 20, 2006: 2913-2921.

Haller J, Verga B, Ledent C, Freund TF, (2004) CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav Pharmacol* 15: 299-304.

Haller J1, Varga B, Ledent C, Freund TF. CB1 cannabinoid receptors mediate anxiolytic effects: convergent genetic and pharmacological evidence with CB1-specific agents. *Behav Pharmacol.* 2004 Jul;15(4):299-304.

Hanson KL, Winward JL, Schweinsburg AD, Medina KL, Brown SA, Tapert SF. Longitudinal study of cognition among adolescent marijuana users over three weeks of abstinence. *Addict Behav.* 35: 970-6, 2010.

Hayatbakhsh MR, Najman JM, Jamrozik K, Mamun AA, Alati, Bor W. Cannabis and anxiety and depression in young adults: a large prospective study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 46: 408-417, 2007.

Henquet C, Di Forti M, Morrison P, Kuepper R, Murray RM. Gene-environment interplay between cannabis and psychosis. *Schizophr Bull.* 34: 1111-1121, 2008.

- Herkenham, M., A.B. Lynn, M.R. Johnson, L.S. Melvin, B.R. de Costa, e K.C. Rice. Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J. Neurosci.* 11, 1991: 563-583.
- Hill EL, Gallopin T, Férézou I, Cauli B, Rossier J, Schweitzer P, Lambolez B. Functional CB1 receptors are broadly expressed in neocortical GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurophysiol.* 2007 Apr;97(4):2580-9.
- Holliday R, and Pugh J.E. (1957) Dna modification mechanism and gene activity during development. *Science* 1987, 226-323.
- Howlett A.C., Champion-Dorow T.M., McMahon L.L., Westlake T.M. (1991) The cannabinoid receptor: biochemical and cellular properties in neuroblastoma cells. *Pharmacol Biochem Behav.* 40: 565-569.
- Huang HS, Matevosian A, Whittle C, Kim SY, Schumacher A, Baker SP, Akbarian S. Prefrontal dysfunction in schizophrenia involves mixed-lineage leukemia 1-regulated histone methylation at GABAergic gene promoters. *J Neurosci.* 2007; 27(42):11254-62.
- Huang, E.J., e L.F. Reichardt. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 2001: 677-736.
- Jacobus J, Tapert SF. Effects of Cannabis on the Adolescent Brain. *Curr Pharm Des.* Jun 14, 2013.
- Jaenisch R, and Bird A, (2003) Epigenetic regulation of gene expression; how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* 33, 245-254.
- Jenuwein, T., e C.D. Allis. Translating the histone code. *Science* 293, 2001: 1074-1080.
- Katona I, Freund TF. Endocannabinoid signaling as a synaptic circuit breaker in neurological disease. *Nat Med.* 2008 Sep;14(9):923-30.
- Katz, L.C., e C.J. Shatz. Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274, 1996: 1133-1138.
- Kauer JA, Malenka RC. Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci.* 2007; 8(11):844-58.



Kawasaki, H., L. Schiltz, R. Chiu, et al. ATF-2 has intrinsic histone acetyltransferase activity which is modulated by phosphorylation. *Nature*, 405, 2000: 195-200.

Kew JN, Richards JG, Mutel V, Kemp JA (1998) Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *J Neurosci* 18:1935–1943.

Kim, J.K., M. Samaranyake, e S. Pradhan. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66, 2009: 596-612.

Klein TW, Newton C, Friedman H. Cannabinoid receptors and the cytokine network. *Adv Exp Med Biol*. 1998;437:215-22.

Koob GF, Kenneth Lloyd G, Mason BJ. Development of pharmacotherapies for drug addiction: a Rosetta stone approach. *Nat Rev Drug Discov*. 2009; 8(6):500–15.

Koob GF, Le Moal M. Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science*. 1997; 278(5335):52–8. [PubMed: 9311926]

Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 128, 2007: 693-705.

Krishnan V, Nestler EJ. The molecular neurobiology of depression. *Nature*. 2008 Oct 16;455(7215):894-902

Kumar A, Choi KH, Renthal W, Tsankova NM, Theobald DE, Truong HT, Russo SJ, Laplant Q, Sasaki TS, Whistler KN, Neve RL, Self DW, Nestler EJ. Chromatin remodeling is a key mechanism underlying cocaine-induced plasticity in striatum. *Neuron*. 2005; 48(2):303–14.

Kundakovic M, Chen Y, Costa E, Grayson DR. DNA methyltransferase inhibitors coordinately induce expression of the human reelin and glutamic acid decarboxylase 67 genes. *Mol Pharmacol*. 2007; 71(3):644–53.

Kundakovic M, Chen Y, Guidotti A, Grayson DR. The reelin and GAD67 promoters are activated by epigenetic drugs that facilitate the disruption of local repressor complexes. *Mol Pharmacol*. 2009; 75(2):342–54.

Le Merrier, J., et al. Protracted abstinence from distinct drugs of abuse shows regulation of a common gene network. *Addiction Biology* 17, 2010: 1-12.

Lee KS, Clough AR, Jaragba MJ, Conigrave KM, Patton GC. Heavy cannabis use and depressive symptoms in three Aboriginal communities in Arnhem Land, Northern Territory. *Med J Aust.* 188: 605–608, 2008.

Lessmann, V., K. Gottmann, e M. Malcangio. «Neurotrophin secretion: current facts and future prospects.» *Prog. Neurobiol.* 69, 2003: 341-374.

Li JH, Wang YH, Wolfe BB, Krueger KE, Corsi L, Stocca G, Vicini S (1998) Developmental changes in localization of NMDA receptor subunits in primary cultures of cortical neurons. *Eur J Neurosci* 10:1704–1715.

Luger, K., e T.J. Richmond. The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 1998: 140-146.

Luna, B. Developmental changes in cognitive control through adolescence. *Adv. Child Dev. Behav.* 37, 2009: 233-278.

Maccarrone M, Rossi S, Bari M, De Chiara V, Fezza F, Musella A, Gasperi V, Prosperetti C, Bernardi G, Finazzi-Agro A and others. 2008. Anandamide inhibits metabolism and physiological actions of 2-arachidonoylglycerol in the striatum. *Nat Neurosci* 11(2):152-9.

Mariana D. Plazas-Mayorca and Kent E. Vrana Proteomic investigation of epigenetics in neuropsychiatric disorders: A missing link between genetics and behavior? *J Proteome Res.* 2011 January 7; 10(1): 58–65.

Marsicano G, Goodenough S, Monory K, Hermann H, Eder M, Cannich A, Azad SC, Cascio MG, Gutiérrez SO, van der Stelt M, López-Rodríguez ML, Casanova E, Schütz G, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Behl C, Lutz B. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity *Science.* 2003 Oct 3;302(5642):84-8.

Marsicano G, Lutz B. Expression of the cannabinoid receptor CB1 in distinct neuronal subpopulations in the adult mouse forebrain. *Eur J Neurosci.* 1999 Dec;11(12):4213-25.

Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*. 1990 Aug 9;346(6284):561-4.

Maze I, Covington HE 3rd, Dietz DM, LaPlant Q, Renthal W, Russo SJ, Mechanic M, Mouzon E, Neve RL, Haggarty SJ, Ren Y, Sampath SC, Hurd YL, Greengard P, Tarakhovsky A, Schaefer A, Nestler EJ. Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science*. 2010 Jan 8;327(5962):213-6.

Maze, I., H.E. 3rd Covington, D.M. Dietz, Q. LaPlant, W. Renthal, et al. Essential role of the histone methyltransferase G9a in cocaine-induced plasticity. *Science* 327, 2010: 213-216.

Maze, I., H.E. 3rd Covington, Q. LaPlant, et al. Histone methylation in the nucleus accumbens controls behavioral responses to cocaine. *Soc. Neurosci. Abs.*

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, et al. Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol*. 1995 Jun 29;50(1):83-90.

Meredith, G.E., S. Callen, e D.A. Scheuer. Brain-derived neurotrophic factor expression is increased in the rat amygdale, piriform cortex and hypothalamus following repeated amphetamine administration. *Brain Res*. 949, 2002: 218-227.

Miller LL, Branconnier RJ. Cannabis: effects on memory and the cholinergic limbic system. *Psychol Bull*. 1983 May;93(3):441-56.

Millhorn DE, Eldridge FL. Role of ventrolateral medulla in regulation of respiratory and cardiovascular systems. *J Appl Physiol* (1985). 1986 Oct;61(4):1249-63.

Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98:427–436.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529–540.

- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*. 1993 Sep 2;365(6441):61-5.
- Nafee, T.M., W.E. Farrell, W.D. Carroll, A.A. Fryer, e K.M. Ismail. Epigenetic control of fetal gene expression. *BFOG* 115, 2008: 158-168.
- Newell-Price, J., A.J. Clark, e P. King. Dna methylation and silencing of gene expression. *Trends Endocrinol. Metab.*, 11, 2000: 142-148.
- Numan, S., et al. «Differential regulation of neurotrophin and trk receptor mRNAs in catecholaminergic nuclei during chronic opiate treatment and withdrawal.» *J. Neurosci.* 18, 1998: 10700-10708.
- O'Tuathaigh CM, Gantois I, Waddington JL. Genetic dissection of the psychotomimetic effects of cannabinoid exposure. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. Nov 12, 2013.
- Parmentier-Batteur, S., K. Jin, L. Xie, X. Ou Mao, e A. Greenberg. DNA microarray analysis of cannabinoid signaling in mouse brain in vivo. *Molecular Pharmacology* 62, 2002: 828-835.
- Pertwee, R.G., A.C. Howlett, M.E. Abood, et al. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol. Rev.* 62, 2010: 588-631.
- Pertwee, R.G., et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol. Rev.* 62, 2010: 588-631.
- Piomelli, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nat Rev Neurosci*, 2003: 873-884.
- Pistis M, Perra S, Pillolla G, Melis M, Gessa GL, Muntoni AL. Cannabinoids modulate neuronal firing in the rat basolateral amygdala: evidence for CB1- and non-CB1-mediated actions. *Neuropharmacology*. 2004 Jan;46(1):115-25.
- Pope HG Jr, Gruber AJ, Hudson JI, Huestis MA, Yurgelun-Todd D. Cognitive measures in long-term cannabis users. *J Clin Pharmacol*. 42: 41S-47S, 2002.

Poulter MO, Du L, Weaver IC, Palkovits M, Faludi G, Merali Z, Szyf M, Anisman H. GABAA receptor promoter hypermethylation in suicide brain: implications for the involvement of epigenetic processes. *Biol Psychiatry*. 2008; 64(8):645–52.

Purves, D., G.J. Augustine, D. Fitzpatrick, W.C. Hall, A.S., McNamara, J.O. LaMantia, e L.E. White. Modification of brain circuits as a result of experience. *Neuroscience*, 2008: 611-633.

Realini N, Vigano D, Guidali C, Zamberletti E, Rubino T, Parolaro D. Chronic URB597 treatment at adulthood reverted most depressive-like symptoms induced by adolescent exposure to THC in female rats. *Neuropharmacology*. 60: 235–243, 2011.

Renard J, Krebs MO, Jay TM, Le Pen G. Long-term cognitive impairments induced by chronic cannabinoid exposure during adolescence in rats: a strain comparison. *Psychopharmacology (Berl)*. 225: 81-90, 2013.

Renthal W, Carle TL, Maze I, Covington HE 3rd, Truong HT, Alibhai I, Kumar A, Montgomery RL, Olson EN, Nestler EJ. Delta FosB mediates epigenetic desensitization of the c-fos gene after chronic amphetamine exposure. *J Neurosci*. 2008 Jul 16;28(29):7344-9.

Renthal, W., e E. Nestler. Chromatin regulation in drug addiction and depression. *Dialogues in Clinical neuroscience*, 11, 2009: 257-268.

Rice, J.C., e C.D. Allis. Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Curr. opin. Cell. Biol.*, 13, 2001: 263-273.

Rinaldi-Carmona M, Congy C, Santucci V, Simiand J, Gautret B, Neliat G, Labeeuw B, Le Fur G, Soubrie P, Breliere JC. Biochemical and pharmacological properties of SR 46349B, a new potent and selective 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992 Aug;262(2):759-68.

Rodgers RJ, Evans PM, Murphy A. Anxiogenic profile of AM-251, a selective cannabinoid CB1 receptor antagonist, in plus-maze-naïve and plus-maze-experienced mice. *Behav Pharmacol*. 2005 Sep;16(5-6):405-13.

Rodriguez MA, Pesold C, Liu WS, Kriho V, Guidotti A, Pappas GD, Costa E. Colocalization of integrin receptors and reelin in dendritic spine postsynaptic densities of adult nonhuman primate cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3550-5.

Rubino T, Prini P, Piscitelli F, Zamberletti E, Trusel M, Melis M, Sagheddu C, Ligresti A, Tonini R, Di Marzo V, Parolaro D. Adolescent exposure to THC in female rats disrupts developmental changes in the prefrontal cortex. *Neurobiol Dis*. 2014 Oct 2;73C:60-69.

Rubino T, Vigano' D, Realini N, Guidali C, Braidà D, Capurro V, Castiglioni C, Cherubino F, Romualdi P, Candeletti S, Sala M, Parolaro D. Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioral and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology*. 33: 2760–2771, 2008.

Rubino T, Zamberletti E, Parolaro D. Adolescent exposure to cannabis as a risk factor for psychiatric disorders. *J Psychopharmacol*. 26: 177-88, 2012.

Rubino T., Realini N., Braidà D., Alberio T., Capurro V et al. The depressive phenotype induced in adult female rats by adolescent exposure to THC is associated with cognitive impairment and altered neuroplasticity in the prefrontal cortex. *Neurotox res* 15, 2009: 291-302.

Rubino T., Realini N., Braidà D., Guidi S., Capurro V., Vigano D. et al. Changes in hippocampal morphology and neuroplasticity induced by adolescent THC treatment are associated with cognitive impairment in adulthood. *Hippocampus* 19, 2009: 763-772.

Rubino, T., et al. Chronic delta 9-tetrahydrocannabinol during adolescence provokes sex-dependent changes in the emotional profile in adult rats: behavioural and biochemical correlates. *Neuropsychopharmacology* 33, 2008: 2760-2771.

Sales AJ, Biojone C, Terceti MS, Guimarães FS, Gomes MV, Joca SR. Antidepressant-like effect induced by systemic and intra-hippocampal

administration of DNA methylation inhibitors. *Br J Pharmacol.* 2011 Nov;164(6):1711-21.

Schatz A.R., Lee M., Die R.B., Pulaski J.T., Kaminski N.E., (1997) Cannabinoid receptor CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicology and applied pharmacology* 142, 278-287.

Schneider M, Koch M. Chronic pubertal, but not adult chronic cannabinoid treatment impairs sensorimotor gating, recognition memory, and the performance in a progressive ratio task in adult rats. *Neuropsychopharmacology.* 28: 1760–1769, 2003.

Schneider M, Koch M. The effect of chronic peripubertal cannabinoid treatment on deficient object recognition memory in rats after neonatal mPFC lesion. *Eur Neuropsychopharmacol.* 17: 180–186, 2007.

Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368:144–147.

Shi J, Aamodt SM, Constantine-Paton M (1997) Temporal correlations between functional and molecular changes in NMDA receptors and GABA neurotransmission in the superior colliculus. *J Neurosci* 17:6264–6276.

Sisk CL1, Zehr JL. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Front Neuroendocrinol.* 2005 Oct-Dec;26(3-4):163-74. Epub 2005 Nov 23.

Snyder EM, Murphy MR. Schizophrenia therapy: beyond atypical antipsychotics. *Nat Rev Drug Discov.* 2008; 7(6):471–2. [PubMed: 18483482]

Solinas M, Justinova Z, Goldberg SR, Tanda G. (2006). Anandamide administration alone and after inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) increases dopamine levels in the nucleus accumbens shell in rats. *J Neurochem* 98(2):408-19.

Solinas M, Tanda G, Justinova Z, Wertheim CE, Yasar S, Piomelli D, Vadivel SK, Makriyannis A, Goldberg SR.( 2007b) The endogenous cannabinoid anandamide

produces delta-9-tetrahydrocannabinol-like discriminative and neurochemical effects that are enhanced by inhibition of fatty acid amide hydrolase but not by inhibition of anandamide transport. *J Pharmacol Exp Ther* 321(1):370-80.

Stella, N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astocytes, and astrocytomas. *Glia*, 58, 2010: 1017-1030.

Strahl, B.D., e C.D. Allis. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403, 2000: 41-45.

Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K. (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215(1):89-97.

Tjeerdema RS. The pyrolysis of cannabinoids. *Rev Environ Contam Toxicol*. 1987;99:61-81.

Tomasiewicz HC1, Jacobs MM, Wilkinson MB, Wilson SP, Nestler EJ, Hurd YL. Proenkephalin mediates the enduring effects of adolescent cannabis exposure associated with adult opiate vulnerability. *Biol Psychiatry*. 2012 Nov 15;72(10):803-10.

Tonissaar M, Herm L, Eller M, Koiv K, Rincken A, Harro J. Rats with high or low sociability are differently affected by chronic variable stress. *Neuroscience*. 152: 867–876, 2008.

Tsai G, Coyle JT (2002) Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:165–179.

Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat Neurosci*. 2006; 9(4):519–25.

UNODC (United Nation Office on Drugs and Crime) 2012. Cannabis: a short review. [http://www.unodc.org/documents/drug-prevention-and-treatment/cannabis\\_review.pdf](http://www.unodc.org/documents/drug-prevention-and-treatment/cannabis_review.pdf) (Accessed January 2014).



- Van den Buuse M. Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: pharmacology and methodology aspects. *Schizophr Bull.* 36: 246–270, 2010.
- Van den Oever, M., et al. Prefrontal cortex AMPA receptor plasticity is crucial for cue-induced relapse to heroin-seeking. *Nat. Neurosci.* 9, 2008: 1053-1058.
- Van Laar M, van Dorsselaer S, Monshouwer K, de Graaf R. Does cannabis use predict the first incidence of mood and anxiety disorders in the adult population? *Addiction.* 102: 1251–1260, 2007.
- Vanyukov MM, Ridenour TA. Common liability to drug addictions: theory, research, practice. *Drug Alcohol Depend.* 123: S1-2, 2012.
- Ventrucci A, Kazdoba TM, Niu S, D'Arcangelo G. Reelin deficiency causes specific defects in the molecular composition of the synapses in the adult brain. *Neuroscience.* 2011 Aug 25;189:32-42.
- Vigano D, Guidali C, Petrosino S, Realini N, Rubino T, Di Marzo V, Parolaro D. Involvement of the endocannabinoid system in phencyclidine-induced cognitive deficits modeling schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol.* 12: 599–614, 2009.
- Waddington, C.H. (1957) *The strategy of the genes; a discussion of some aspects of theoretical Biology* (London: Allen & Unwin).
- Wang, Y., e F.C. Leung. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics*, 20, 2004: 1170-1177.
- Weber, M., e D. Schubeler. Genomic patterns of DNA methylation: targets and function of an epigenetic mark. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 19, 2007: 273-280.
- Wegener N, Koch M. Behavioural disturbances and altered Fos protein expression in adult rats after chronic pubertal cannabinoid treatment. *Brain Res.* 1253: 81–91, 2009.
- Whitford, T.J., C.J. Rennie, S.M. Grieve, C.R. Clark, E. Gordon, e L.M. Williams. Brain maturation in adolescence: concurrent changes in neuroanatomy and neurophysiology. *hum. Brain Mapp.* 28, 2007: 228-237.

Wilson RI, Nicoll RA. (2002) Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296(5568):678-82.

World Health Organization. Depression. [Accessed on Dec 3rd, 2009].  
[http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/definition/en/](http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/)

Yang X, Hegde VL1, Rao R1, Zhang J2, Nagarkatti PS1, Nagarkatti M. Histone modifications are associated with  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-mediated alterations in antigen-specific T cell responses. *J Biol Chem*. 2014 Jul 4;289(27):18707-18.

Zamberletti E, Beggiato S, Steardo L Jr, Prini P, Antonelli T, Ferraro L, Rubino T, Parolaro D. Alterations of prefrontal cortex GABAergic transmission in the complex psychotic-like phenotype induced by adolescent delta-9-tetrahydrocannabinol exposure in rats. *Neurobiol Dis*. 63C: 35-47, 2013.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400(6743):452-7.